

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION RELATING TO PRIORITY CLAIM

(PCT Rules 26bis.1 and 26bis.2 and
Administrative Instructions, Sections 402 and 409)

To:

VOSSIUS & PARTNER
Siebertstrasse 4
D-81675 München
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 30 June 1999 (30.06.99)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference D 1226 PCT/a	
International application No. PCT/EP99/02165	International filing date (day/month/year) 29 March 1999 (29.03.99)
Applicant MULTHOFF, Gabriele	

The applicant is hereby notified of the following in respect of the priority claim(s) made in the international application.

1. ☒ **Correction of priority claim.** In accordance with the applicant's notice received on: 07 June 1999 (07.06.99), the following priority claim has been corrected to read as follows:
EP 26 March 1999 (26.03.99) PCT/EP99/02056
☐ even though the indication of the number of the earlier application is missing.
☐ even though the following indication in the priority claim is not the same as the corresponding indication appearing in the priority document:
2. ☐ **Addition of priority claim.** In accordance with the applicant's notice received on: , the following priority claim has been added:
☐ even though the indication of the number of the earlier application is missing.
☐ even though the following indication in the priority claim is not the same as the corresponding indication appearing in the priority document:
3. ☐ As a result of the correction and/or addition of (a) priority claim(s) under items 1 and/or 2, the (earliest) priority date is:
4. ☐ **Priority claim considered not to have been made.**
☐ The applicant failed to respond to the Invitation under Rule 26bis.2(a) (Form PCT/IB/316) within the prescribed time limit.
☐ The applicant's notice was received after the expiration of the prescribed time limit under Rule 26bis.1(a).
☐ The applicant's notice failed to correct the priority claim so as to comply with the requirements of Rule 4.10.
The applicant may, before the technical preparations for international publication have been completed and subject to the payment of a fee, request the International Bureau to publish, together with the international application, information concerning the priority claim. See Rule 26bis.2(c) and the PCT Applicant's Guide, Volume I, Annex B2(IIb).
5. ☐ In case where multiple priorities have been claimed, the above item(s) relate to the following priority claim(s):
6. A copy of this notification has been sent to the receiving Office and
☒ to the International Searching Authority (where the international search report has not yet been issued).
☒ the designated Offices (which have already been notified of the receipt of the record copy).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer Céline Faust Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	---

PCT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
 United States Patent and Trademark
 Office
 Box PCT
 Washington, D.C. 20231
 ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 03 November 1999 (03.11.99)	Applicant's or agent's file reference D 1226 PCT/a
International application No. PCT/EP99/02165	Priority date (day/month/year) 27 March 1998 (27.03.98)
International filing date (day/month/year) 29 March 1999 (29.03.99)	
Applicant MULTHOFF, Gabriele	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
20 September 1999 (20.09.99)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer F. Baechler Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

REC'D 31 JUL 2000

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT PCT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts D 1226 PCT/a	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/02165	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 29/03/1999	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 27/03/1998
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK A61K38/17		
Anmelder MULTHOFF, Gabriele		


- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 7 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

 Diese Anlagen umfassen insgesamt 5 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☒ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderische Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☒ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 20/09/1999	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 26.07.2000
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Markopoulos, E Tel. Nr. +49 89 2399 8658



I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-26 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-30 eingegangen am 13/07/2000 mit Schreiben vom 12/07/2000

Zeichnungen, Blätter:

1-8 ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

3. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erfinderischer Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

- ☐ die gesamte internationale Anmeldung.
- ☒ Ansprüche Nr. 18-23, 29-30 in respect of industrial applicability.

Begründung:

- ☒ Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. 18-23, 29-30 beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):
- siehe Beiblatt**
- ☐ Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):
- ☐ Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.
- ☐ Für die obengenannten Ansprüche Nr. wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-30
	Nein: Ansprüche	-
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-30
	Nein: Ansprüche	-
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-17, 24-28
	Nein: Ansprüche	-

2. Unterlagen und Erklärungen

siehe Beiblatt

VI. Bestimmte angeführte Unterlagen

1. Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)

und / oder

2. Nicht-schriftliche Offenbarungen (Regel 70.9)

siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:

siehe Beiblatt

Zu Punkt III

Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

Die Ansprüche 18-23 und 29-30 beziehen sich auf einen Gegenstand, der nach Auffassung dieser Behörde unter die Regel 67.1 (iv) PCT fällt. Daher wird über die gewerbliche Anwendbarkeit des Gegenstands dieser Ansprüche kein Gutachten erstellt (Artikel 34(4) a) (i) PCT).

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Regel 66.2(a)(ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

D1: G. MULTHOFF ET AL.: 'The role of heat shock proteins in the stimulation of an immune response.' BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 379, Nr. 3, März 1998 (1998-03), Seiten 295-300, XP002118462 in der Anmeldung erwähnt

D2: Y. TAMURA ET AL.: 'Immunotherapy of tumors with autologous tumor-derived heat shock protein preparations.' SCIENCE, Bd. 278, Nr. 5335, 3. Oktober 1997 (1997-10-03), Seiten 117-120, XP002118457 Washington, DC, USA in der Anmeldung erwähnt

D3: H. UDONO ET AL.: 'Comparison of tumor-specific immunogenicities of stress-induced proteins gp96, hsp90, and hsp70.' THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, Bd. 152, Nr. 11, 1. Juni 1994 (1994-06-01), Seiten 5398-5403, XP002118460 Baltimore, MD, USA

2. D1 offenbart die Aktivität von Hsp70, eine Immunantwort zu induzieren, wodurch die Lyse von Tumorzellen durch NK-Zellen erhöht wird. Es konnte gezeigt werden, daß Hsp70 verstärkt auf der Zelloberfläche von Sarcoma- und Lymphomazellen exprimiert wird und direkt mit der Immunantwort in Zusammenhang steht (S. 297, Sp. 2, Z. 54 - S. 298, Sp. 1, Z. 7). Auch D2 und D3 beschreiben die Wirksamkeit von Hitzeschockproteinen bei der

Bekämpfung von Tumoren, wobei Hsp aus autologen Tumoren gewonnen werden und mit Peptiden komplexiert sind.

Da diejenigen Hsp70-Proteine, welche mit Peptiden komplexiert und aus Tumorzellen isoliert worden sind, aus dem Schutzbereich der Ansprüche ausgeschlossen sind, können die Ansprüche 1-6, die sich auf die Verwendung von Hsp70-Proteinen beziehen, Ansprüche 7-17 und 19-23, die sich auf ein Verfahren zur Aktivierung von NK-Zellen beziehen, und Ansprüche 24-28 als neu anerkannt werden.

Die Ansprüche 18 und 29-30 sind auf die Verwendung von speziell behandelten NK-Zellen zur Aktivierung des Immunsystems gerichtet und erfüllen das in Artikel 33(2) PCT genannte Kriterium in Bezug zu Neuheit ebenfalls.

3. Die mit der vorliegenden Erfindung zu lösende Aufgabe kann darin gesehen werden, daß der therapeutische Einsatz von Hsp70-Protein viel universeller und einfacher erfolgt und nicht abhängig vom jeweiligen Tumormaterial ist. Indem die Wirkung von isoliertem Hsp70 gezeigt wird, wird auch das technische Vorurteil, daß isolierte Hitzeschockproteine bzw. nicht mit Peptiden komplexierte keine immunogenen Wirkungen mehr aufweisen (D3: S. 5402, Sp. 1, Z. 10-35), beseitigt.

Die Ansprüche 1-17 und 19-28 scheinen das in Artikel 33(3) PCT genannte Kriterium in Bezug zu erfinderischer Tätigkeit zu erfüllen, da die Verwendung von nicht mit Proteinen komplexiertem Hsp70-Protein für den Fachmann nicht offensichtlich ist und D1-D3 teilweise im Widerspruch zur vorliegenden Anmeldung stehen.

Die in den Ansprüchen 18 und 29-30 der vorliegenden Anmeldung für diese Aufgabe vorgeschlagene Lösung scheint ebenfalls auf einer erfinderischen Tätigkeit zu beruhen, da die Aktivierung von Killerzellen in der Tumorthherapie mittels nicht-komplexiertem Hsp70 in keinem der vorliegenden Dokumente nahegelegt wird.

4. Für die Beurteilung der Frage, ob die Gegenstände der vorliegenden Ansprüche 18-23 und 29-30 gewerblich anwendbar sind, gibt es in den PCT-Vertragsstaaten keine einheitlichen Kriterien. Die Patentierbarkeit kann auch von der Formulierung der Ansprüche abhängen. Das EPA beispielsweise erkennt den Gegenstand von Ansprüchen,

die auf die medizinische Anwendung einer Verbindung gerichtet sind, nicht als gewerblich anwendbar an; es können jedoch Ansprüche zugelassen werden, die auf eine bekannte Verbindung zur erstmaligen medizinischen Anwendung und die Verwendung einer solchen Verbindung zur Herstellung eines Arzneimittels für eine neue medizinische Anwendung gerichtet sind.

Zu Punkt VI

Bestimmte angeführte Unterlagen

Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)

Anmelde Nr. Patent Nr.	Veröffentlichungsdatum (Tag/Monat/Jahr)	Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)	Prioritätsdatum (zu Recht beansprucht) (Tag/Monat/Jahr)
EP-A-843 005	20. Mai 1998	13. Nov. 1997	15. Nov. 1996

Zu Punkt VIII

Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

1. Anspruch 20 wird nicht, wie in Artikel 6 PCT vorgeschrieben, durch die Beschreibung gestützt, da sein Umfang über den durch die Beschreibung gerechtfertigten Umfang hinausgeht. Die Gründe dafür sind die folgenden: "Autoimmunerkrankungen" werden an keiner Stelle in der Beschreibung erwähnt.

2. Die Ansprüche 5, 6, 11, 12 sind nicht klar und erfüllen die Erfordernisse des Artikels 6 PCT insofern nicht, als der Gegenstand des Schutzbegehrens nicht klar definiert ist. Mit der funktionellen Angabe "Zellen von Patienten mit Infektionskrankheiten" sind prinzipiell alle Zellen des Patienten gemeint, was laut den o.g. Ansprüchen zu einer gesteigerten zytolytischen Aktivität aller Zellen führt.

PCT/EP99/02056

MULTHOFF, Gabriele

u.Z.: D 1226 PCT/a

Ansprüche

1. Verwendung eines Hsp70-Proteins, das nicht mit Peptiden komplexiert ist, wenn es zusammen mit diesen aus Tumorzellen isoliert wurde, eines C-terminalen Fragmentes davon oder eines Derivats davon oder eines Proteins mit einer Aminosäuresequenzhomologie zum Bereich von Aminosäuren 384-641 des Hsp70-Proteins von $\geq 70\%$ zur Herstellung eines Arzneimittels, Medizinprodukts, oder medizinischen Hilfsstoffs zur Aktivierung von NK-Zellen.
2. Verwendung eines Hsp70-Proteins, das nicht mit Peptiden komplexiert ist, wenn es zusammen mit diesen aus Tumorzellen isoliert wurde, eines C-terminalen Fragmentes davon oder eines Derivats davon oder eines Proteins mit einer Aminosäuresequenzhomologie zum Bereich von Aminosäuren 384-641 des Hsp70-Proteins von $\geq 70\%$ zur in vitro oder ex vivo Aktivierung von NK-Zellen.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Aktivierung die Induktion einer durch NK-Zellen vermittelten Immunantwort umfaßt.
4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Aktivierung eine Stimulation der Proliferation von NK-Zellen und/oder eine Steigerung der zytolytischen Aktivität von NK-Zellen einschließt.
5. Verwendung nach Anspruch 4, wobei die zytolytische Aktivität gegenüber Tumorzellen, Zellen von Patienten mit Infektionserkrankungen gesteigert ist.
6. Verwendung nach Anspruch 5, wobei die zytolytische Aktivität gegenüber Leukämiezellen, Lymphomzellen, Tumorzellen, metastasierenden Zellen solider Tumore und Zellen von Patienten mit viralen, mykotischen und/oder bakteriellen Infektionserkrankungen gesteigert ist.

GEÄNDERTES BLATT

AMENDED SHEET



7. Verfahren zur ex-vivo oder in-vitro Aktivierung von NK-Zellen, wobei man eine NK-Zellen enthaltende physiologische Zellsuspension mit einem Hsp70-Protein, das nicht mit Peptiden komplexiert ist, wenn es zusammen mit diesen aus Tumorzellen isoliert wurde, einem C-terminalen Fragment davon oder einem Derivat davon oder einem Protein mit einer Aminosäuresequenz-homologie zum Bereich von Aminosäure 384-641 des Hsp70-Proteins von $\geq 70\%$ vermischt und inkubiert, um eine Aktivierung der NK-Zellen zu bewirken.
8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei die Aktivierung eine Stimulation der Proliferation der NK-Zellen und/oder eine Steigerung ihrer Zytotoxizität umfaßt.
9. Verfahren nach Anspruch 7 oder 8, wobei als NK-Zellen enthaltende physiologische Zellsuspension periphere, mononukleäre Blutzellen oder eine NK-Zellen enthaltende Fraktion hiervon eingesetzt werden.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 9, wobei die Zellsuspension weiterhin Hsp70 auf der Zelloberfläche exprimierende menschliche oder tierische Zellen enthält.
11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei als menschliche oder tierische Zellen Tumorzellen, Zellen von Patienten mit Infektionserkrankungen eingesetzt werden.
12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei als menschliche oder tierische Zellen Leukämiezellen, Lymphomzellen, Tumorzellen, metastasierende Zellen solider Tumore und Zellen von Patienten mit viralen, mykotischen und/oder bakteriellen Infektionserkrankungen eingesetzt werden.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 12, wobei die die Zellen und Proteine enthaltende physiologische Zellsuspension mindestens 3 Stunden inkubiert wird.
14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei die Inkubation 4 Tage lang vorgenommen wird.

15. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6 oder Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 14, wobei zusätzlich ein Zytokin eingesetzt wird.
16. Verwendung oder Verfahren nach Anspruch 15, wobei als Zytokin ein Interleukin eingesetzt wird.
17. Verwendung oder Verfahren nach Anspruch 16, wobei als Interleukin IL-2, IL-12 oder IL-15 eingesetzt wird.
18. Verfahren zur in vivo-Aktivierung des Immunsystems, wobei man einem Patienten eine pharmazeutisch wirksame Menge von nach dem Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 17 aktivierten NK-Zellen verabreicht, gegebenenfalls in Kombination mit oder zeitlich vor einer pharmazeutisch wirksamen Menge eines Hsp70-Proteins, eines C-terminalen Fragmentes davon oder eines Derivats davon oder eines Proteins mit einer Aminosäuresequenzhomologie zum Bereich von Aminosäure 384-641 des Hsp70-Proteins von $\geq 70\%$ verabreicht.
19. Verfahren zur in vivo-Aktivierung von NK-Zellen, wobei man einem Patienten eine pharmazeutisch wirksame Menge eines Hsp70-Proteins, das nicht mit Peptiden komplexiert ist, wenn es zusammen mit diesen aus Tumorzellen isoliert wurde, eines C-terminalen Fragmentes davon oder eines Derivats davon oder eines Proteins mit einer Aminosäuresequenzhomologie zum Bereich von Aminosäure 384-641 des Hsp70-Proteins von $\geq 70\%$ verabreicht.
20. Verfahren zur Behandlung von Tumoren, Krebserkrankungen, Infektionskrankheiten oder Autoimmunerkrankungen, wobei man einem Patienten eine pharmazeutisch wirksame Menge von nach dem Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 17 aktivierten NK-Zellen und/oder eines Hsp70-Proteins, das nicht mit Peptiden komplexiert ist, wenn es zusammen mit diesen aus Tumorzellen isoliert wurde, eines C-terminalen Fragmentes davon oder eines Derivats davon oder eines Proteins mit einer

Aminosäuresequenzhomologie zum Bereich von Aminosäure 384-641 des Hsp70-Proteins von $\geq 70\%$ verabreicht.

21. Verfahren nach Anspruch 20, wobei der Tumor ein solider Tumor oder eine Metastase ist.
22. Verfahren nach Anspruch 20, wobei die Krebserkrankung Leukämie oder ein Lymphom ist.
23. Verfahren nach Anspruch 20, wobei die Infektionskrankheit viralen, mykologischen oder bakteriellen Ursprungs ist.
24. Arzneimittel, Medizinprodukt oder medizinischer Hilfsstoff das/der ein Hsp70-Protein, ein C-terminales Fragment davon oder ein Derivat davon oder ein Protein mit einer Aminosäuresequenzhomologie zum Bereich von Aminosäure 384-641 des Hsp70-Proteins von $\geq 70\%$ und/oder von nach dem Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 17 aktivierten NK-Zellen in einer therapeutisch wirksamen Menge sowie gegebenenfalls übliche Träger- und/oder Hilfsstoffe enthält mit Ausnahme von Hsp70-Protein, das mit Peptiden komplexiert ist, wenn es zusammen mit diesen aus Tumorzellen isoliert wurde.
25. Arzneimittel, Medizinprodukt oder medizinischer Hilfsstoff nach Anspruch 24, wobei das Protein in einer Konzentration von mindestens $1 \mu\text{g/ml}$, bevorzugt bis zu $1000 \mu\text{g/ml}$, vorliegt.
26. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6 oder Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 23 oder Arzneimittel, Medizinprodukt oder medizinischer Hilfsstoff nach Anspruch 24 oder 25, wobei das Hsp70-Protein ein humanes Protein ist.
27. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6 oder 26 oder Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 23 oder 26 oder Arzneimittel, Medizinprodukt oder medizinischer Hilfsstoff nach einem der Ansprüche 24 bis 26, wobei das

Hsp70-Protein oder dessen Fragment oder Derivat ein rekombinantes Protein ist.

28. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, 26 oder 27 oder Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 23, 26 oder 27 oder Arzneimittel, Medizinprodukt oder medizinischer Hilfsstoff nach einem der Ansprüche 24 bis 27, wobei das Hsp70-Protein das C-terminale Fragment die Aminosäuren 384 bis 561 von menschlichem Hsp70 oder den entsprechenden Bereich aus einem anderem Hsp70 umfaßt, das die erfindungsgemäßen Wirkungen umfaßt.
29. Verwendung der nach einem Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche behandelten NK-Zellen zur Therapie von Tumorerkrankungen, und/oder Infektionserkrankungen.
30. Verwendung nach Anspruch 29, wobei die Therapie durch Reinfundierung der behandelten NK-Zellen erfolgt.

GEÄNDERTES PLATT

09/646835
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference D 1226 PCT/a	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP99/02165	International filing date (day/month/year) 29 March 1999 (29.03.99)	Priority date (day/month/year) 27 March 1998 (27.03.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 38/17, 35/26		
Applicant MULTHOFF, Gabriele		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>7</u> sheets, including this cover sheet. <input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of <u>5</u> sheets.
3. This report contains indications relating to the following items: I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input checked="" type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability: citations and explanations supporting such statement VI <input checked="" type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 20 September 1999 (20.09.99)	Date of completion of this report 26 July 2000 (26.07.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP99/02165

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-26, as originally filed,
 pages _____, filed with the demand,
 pages _____, filed with the letter of _____,
 pages _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the claims, Nos. _____, as originally filed,
 Nos. _____, as amended under Article 19,
 Nos. _____, filed with the demand,
 Nos. 1-30, filed with the letter of 12 July 2000 (12.07.2000),
 Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the drawings, sheets/fig 1-8, as originally filed,
 sheets/fig _____, filed with the demand,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP99/02165

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application.
- ☒ claims Nos. 18-23, 29-30

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 18-23, 29-30 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. _____ are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

- ☐ the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

- ☐ no international search report has been established for said claims Nos. _____

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 99/02165

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: III

Claims 18 to 23 and 29 to 30 concern subject matter which, in the opinion of this Authority, is covered by PCT Rule 67.1(iv). No opinion with regard to industrial applicability is therefore established for the subject matter of these claims (PCT Article 34(4)(a)(i)).

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 99/02165

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-30	YES
	Claims	-	NO
Inventive step (IS)	Claims	1-30	YES
	Claims	-	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-17, 24-28	YES
	Claims	-	NO

2. Citations and explanations**1. Attention is drawn to the following documents:**

D1: G. MULTHOFF ET AL.: "The role of heat shock proteins in the stimulation of an immune response". BIOLOGICAL CHEMISTRY, Vol. 379, No. 3, March 1998 (1998-03), pages 295 to 300, XP002118462, mentioned in the application

D2: Y. TAMURA ET AL.: "Immunotherapy of tumors with autologous tumor-derived heat shock protein preparations". SCIENCE, Vol. 278, No. 5335, 3 October 1997 (1997-10-03), pages 117 to 120, XP002118457, Washington, DC, USA, mentioned in the application

D3: H. UDONO ET AL.: "Comparison of tumor-specific immunogenicities of stress-induced proteins gp96, hsp90, and hsp70". THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, Vol. 152, No. 11, 1 June 1994 (1994-06-01), pages 5398 to 5403, XP002118460, Baltimore, MD, USA.

2. D1 discloses the fact that hsp70 activity stimulates an immune response, thereby increasing the lysis of tumour cells by NK cells. D1 showed that hsp70 is expressed to an increased extent on the cell surface of sarcoma and

lymphoma cells and is directly related to immune response (page 297, column 2, line 54, to page 298, column 1, line 7): D2 and D3 also describe the efficacy of heat shock proteins in the control of tumours, hsp being derived from autologous tumours and being complexed with peptides.

In the present application, hsp70 proteins which have been complexed with peptides and isolated from tumour cells are excluded from the scope of protection of the claims.

Claims 1 to 6, which relate to the use of hsp70 proteins, Claims 7 to 17 and 19 to 23, which relate to a method of activating NK cells, and Claims 24 to 28 can therefore be regarded as novel.

Claims 18 and 29 to 30 are directed to the use of specially treated NK cells to activate the immune system and likewise satisfy the novelty criterion of PCT Article 33(2).

3. The problem addressed by the present invention can be seen as being to enable hsp70 protein to be used much more universally and easily for therapeutic purposes, irrespective of the particular tumour material. The technical prejudice that isolated heat shock proteins which have not been complexed with peptides no longer exhibit an immunogenic action (D3: page 5402, column 1, lines 10 to 35) is also overcome by the demonstration of the action of isolated hsp70.

Claims 1 to 17 and 19 to 28 appear to satisfy the inventive step criterion of PCT Article 33(3), since the use of hsp70 protein not complexed with peptides is not obvious to a person skilled in the art, and since D1 to D3 conflict with the present application in some respects.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 99/02165

The solution to this problem as suggested in Claims 18 and 29 to 30 of the present application also appears to involve an inventive step, since the activation of killer cells in tumour therapy using non-complexed hsp70 is not obvious from any of the available documents.

4. The PCT Contracting States do not have uniform criteria for assessing the industrial applicability of the subject matter of Claims 18 to 23 and 29 to 30 in their present form. Patentability can also depend on the wording of the claims. The EPO, for example, does not recognize industrial applicability of claims to the use of a compound in a medical treatment; it does, however, allow claims to the first use of a known compound in a medical treatment or to the use of such a compound to manufacture a drug for a new medical treatment.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP99/02165

VI. Certain documents cited

1. Certain published documents (Rule 70.10)

<u>Application No. Patent No.</u>	<u>Publication date (day/month/year)</u>	<u>Filing date (day/month/year)</u>	<u>Priority date (valid claim) (day/month/year)</u>
EP-A-843 005	20 May 1998 (20.05.1998)	13 November 1997 (13.11.1997)	15 1996 (15.00.1996)

2. Non-written disclosures (Rule 70.9)

<u>Kind of non-written disclosure</u>	<u>Date of non-written disclosure (day/month/year)</u>	<u>Date of written disclosure referring to non-written disclosure (day/month/year)</u>
---------------------------------------	--	--

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 99/02165

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1. Contrary to PCT Article 6, Claim 20 is not supported by the description, since its scope goes beyond the scope justified by the description. The reasons are that "autoimmune diseases" are not mentioned anywhere in the description.

2. Claims 5, 6, 11 and 12 are not clear and do not satisfy the requirements of PCT Article 6, because the subject matter for which protection is sought is not clearly defined. The functional statement "cells of patients with infectious diseases" means, in principle, all the patient's cells. According to these claims, this leads to increased cytolytic activity in all cells.

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS**

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts D 1226 PCT/a	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 99/ 02165	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 29/03/1999	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 27/03/1998
Anmelder MULTHOFF, Gabriele		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 6 Blätter.



Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.



Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das



in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.



zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.



bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.



bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.



Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.



Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☒ **Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen** (siehe Feld I).

3. ☐ **Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung** (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung



wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.



wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

VERWENDUNG VON HSP70 PROTEIN

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung



wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.



wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. _____



wie vom Anmelder vorgeschlagen



weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.



weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.



keine der Abb.

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.1

Obwohl die Ansprüche 18-23, 29 und 30 (alle völlig) und die Ansprüche 26-28 (alle teilweise, so weit es sich handelt um ein in vivo Verfahren) sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGESTANDES
IPK 6 A61K38/17 A61K39/26

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^o	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	S. SUZUKI ET AL.: "IL-12 induced enhancement of MHC class I antigen expression on cancer cells." PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, Bd. 37, März 1996 (1996-03), Seite 445 XP002118456 USA Zusammenfassung 3036 --- -/--	15-17

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

^o Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

12. Oktober 1999

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

28/10/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Nooij, F

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGEFÜHRTE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>Y. TAMURA ET AL.: "Immunotherapy of tumors with autologous tumor-derived heat shock protein preparations." SCIENCE, Bd. 278, Nr. 5335, 3. Oktober 1997 (1997-10-03), Seiten 117-120, XP002118457 Washington, DC, USA in der Anmeldung erwähnt Seite 118, rechte Spalte, Zeile 11 - Zeile 32</p> <p>---</p>	1-30
A	<p>G. MULTHOFF ET AL.: "CD3- large granular lymphocytes recognize a heat-inducible immunogenic determinant associated with the 72-kD heat shock protein on human sarcoma cells." BLOOD, Bd. 86, Nr. 4, 15. August 1995 (1995-08-15), Seiten 1374-1382, XP002090860 New York, NY, USA das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1-30
A	<p>C. SAVARY ET AL.: "Role of heat shock proteins (Hsp) in immunity to breast cancer." BREAST CANCER RESEARCH AND TREATMENT, Bd. 46, Nr. 1, Oktober 1997 (1997-10), Seite 69 XP002118458 Den Haag, Niederlande das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1-30
A	<p>G. MULTHOFF ET AL.: "Heat shock proteins and the immune response." ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES, Bd. 851, 1998, Seiten 86-93, XP002118459 New York, NY, USA Seite 89, Zeile 3 - Zeile 30</p> <p>---</p>	1-30
A	<p>H. UDONO ET AL.: "Comparison of tumor-specific immunogenicities of stress-induced proteins gp96, hsp90, and hsp70." THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, Bd. 152, Nr. 11, 1. Juni 1994 (1994-06-01), Seiten 5398-5403, XP002118460 Baltimore, MD, USA Zusammenfassung Seite 5402, linke Spalte, Zeile 10 - Zeile 35</p> <p>---</p>	1-30
	<p>---</p> <p>-/--</p>	

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGEKÜNDIGTE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden	Betr. Anspruch Nr.
A	C. BOTZLER ET AL.: "Definition of extracellular localized epitopes of Hsp70 involved in an NK immune response." CELL STRESS AND CHAPERONES, Bd. 3, Nr. 1, März 1998 (1998-03), Seiten 6-11, XP002118461 in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung ---	1-30
A	G. MULTHOFF ET AL.: "The role of heat shock proteins in the stimulation of an immune response." BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 379, Nr. 3, März 1998 (1998-03), Seiten 295-300, XP002118462 in der Anmeldung erwähnt Seite 296, rechte Spalte, Zeile 21 -Seite 297, linke Spalte, Zeile 2 Seite 297, rechte Spalte, Zeile 54 -Seite 298, linke Spalte, Zeile 25 ---	1-30
P,A	EP 0 843 005 A (GSF-FORSCHUNGSZENTRUM FÜR UMWELT UND GESUNDHEIT GMBH) 20. Mai 1998 (1998-05-20) Seite 4, Zeile 16 - Zeile 19 Seite 5, Zeile 18 - Zeile 49 -----	1-30

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

Absender: MIT DER INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNG BEAUFTRAGTE BEHÖRDE

An:

VOSSIUS & PARTNER
VOSSIUS & PARTNER
Siebertstrasse 4
81675 München
ALLEMAGNE

EINGEGANGEN
Vossius & Partner

27. Juli 2000

Frist
bearb.

PCT

MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERSENDUNG
DES INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNGSBERICHTS

(Regel 71.1 PCT)

Absendedatum
(Tag/Monat/Jahr)

26.07.2000

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts
D 1226 PCT/a

WICHTIGE MITTEILUNG

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP99/02165

Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)
29/03/1999

Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)
27/03/1998

Anmelder

MULTHOFF, Gabriele

1. Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß ihm die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde hiermit den zu der internationalen Anmeldung erstellten internationalen vorläufigen Prüfungsbericht, gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen, übermittelt.
2. Eine Kopie des Berichts wird - gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen - dem Internationalen Büro zur Weiterleitung an alle ausgewählten Ämter übermittelt.
3. Auf Wunsch eines ausgewählten Amtes wird das Internationale Büro eine Übersetzung des Berichts (jedoch nicht der Anlagen) ins Englische anfertigen und diesem Amt übermitteln.

4. ERINNERUNG

Zum Eintritt in die nationale Phase hat der Anmelder vor jedem ausgewählten Amt innerhalb von 30 Monaten ab dem Prioritätsdatum (oder in manchen Ämtern noch später) bestimmte Handlungen (Einreichung von Übersetzungen und Entrichtung nationaler Gebühren) vorzunehmen (Artikel 39 (1)) (siehe auch die durch das Internationale Büro im Formblatt PCT/IB/301 übermittelte Information).

Ist einem ausgewählten Amt eine Übersetzung der internationalen Anmeldung zu übermitteln, so muß diese Übersetzung auch Übersetzungen aller Anlagen zum internationalen vorläufigen Prüfungsbericht enthalten. Es ist Aufgabe des Anmelders, solche Übersetzungen anzufertigen und den betroffenen ausgewählten Ämtern direkt zuzuleiten.

Weitere Einzelheiten zu den maßgebenden Fristen und Erfordernissen der ausgewählten Ämter sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragten Behörde



Europäisches Patentamt
D-80298 München
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Bevollmächtigter Bediensteter

Senkel, H

Tel. +49 89 2399-8071



PCT

ANTRAG

Der Unterzeichnete beantragt, daß die vorliegende internationale Anmeldung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens behandelt wird.

Vom Anmeldeamt auszufüllen

Internationales Aktenzeichen

Internationales Anmeldedatum

Name des Anmeldeamts und "PCT International Application"

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts (falls gewünscht)
(max. 12 Zeichen) D 1226 PCT/a

Feld Nr. I BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG

Neue Verwendung von Hsp70-Proteinen

Feld Nr. II ANMELDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

MULTHOFF, Gabriele
Kirchenstraße 17c
D-81675 München
DE

☒ Diese Person ist gleichzeitig Erfinder

Telefonnr.:

Telefaxnr.:

Fernschreibnr.:

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:



alle Bestimmungsstaaten



alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika



nur die Vereinigten Staaten von Amerika



die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder

☐ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:



alle Bestimmungsstaaten



alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika



nur die Vereinigten Staaten von Amerika



die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

☐ Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben.

Feld Nr. IV ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ODER ZUSTELLANSCHRIFT

Die folgende Person wird hiermit bestellt/ist bestellt worden, um für den (die) Anmelder vor den zuständigen internationalen Behörden in folgender Eigenschaft zu handeln als: ☒ Anwalt ☐ gemeinsamer Vertreter

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

Vossius & Partner
Siebertstr. 4
D-81675 München
DE

Telefonnr.:
(089) 41 30 40

Telefaxnr.:
(089) 41 30 41 11

Fernschreibnr.:

☐ **Zustellanschrift:** Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben ist.

Feld Nr. V BESTIMMUNG VON PATENTEN

Die folgenden Bestimmungen nach Regel 4.9 Absatz a werden hiermit vorgenommen (bitte die entsprechenden Kästchen ankreuzen; wenigstens ein Kästchen muß angekreuzt werden):

Regionales Patent

- ☐ **AP ARIPO-Patent:** GH Ghana, GM Gambia, KE Kenia, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SZ Swasiland, UG Uganda, ZW Simbabwe und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Harare-Protokolls und des PCT ist
- ☐ **EA Eurasisches Patent:** AM Armenien, AZ Aserbaidschan, BY Belarus, KG Kirgisistan, KZ Kasachstan, MD Republik Moldau, RU Russische Föderation, TJ Tadschikistan, TM Turkmenistan und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Eurasischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☒ **EP Europäisches Patent:** AT Österreich, BE Belgien, CH und LI Schweiz und Liechtenstein, CY Zypern, DE Deutschland, DK Dänemark, ES Spanien, FI Finnland, FR Frankreich, GB Vereinigtes Königreich, GR Griechenland, IE Irland, IT Italien, LU Luxemburg, MC Monaco, NL Niederlande, PT Portugal, SE Schweden und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☐ **OA OAPI-Patent:** BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Zentralafrikanische Republik, CG Kongo, CI Côte d'Ivoire, CM Kamerun, GA Gabun, GN Guinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauretanien, NE Niger, SN Senegal, TD Tschad, TG Togo und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat der OAPI und des PCT ist (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben)

Nationales Patent (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben):

- | | |
|---|--|
| <input type="checkbox"/> AL Albanien | <input type="checkbox"/> LS Lesotho |
| <input type="checkbox"/> AM Armenien | <input type="checkbox"/> LT Litauen |
| <input type="checkbox"/> AT Österreich | <input type="checkbox"/> LU Luxemburg |
| <input type="checkbox"/> AU Australien | <input type="checkbox"/> LV Lettland |
| <input type="checkbox"/> AZ Aserbaidschan | <input type="checkbox"/> MD Republik Moldau |
| <input type="checkbox"/> BA Bosnien-Herzegowina | <input type="checkbox"/> MG Madagaskar |
| <input type="checkbox"/> BB Barbados | <input type="checkbox"/> MK Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien |
| <input type="checkbox"/> BG Bulgarien | <input type="checkbox"/> MN Mongolei |
| <input type="checkbox"/> BR Brasilien | <input type="checkbox"/> MW Malawi |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Kanada | <input type="checkbox"/> MX Mexiko |
| <input type="checkbox"/> CH und LI Schweiz und Liechtenstein | <input type="checkbox"/> NO Norwegen |
| <input type="checkbox"/> CN China | <input type="checkbox"/> NZ Neuseeland |
| <input type="checkbox"/> CU Kuba | <input type="checkbox"/> PL Polen |
| <input type="checkbox"/> CZ Tschechische Republik | <input type="checkbox"/> PT Portugal |
| <input type="checkbox"/> DE Deutschland | <input type="checkbox"/> RO Rumänien |
| <input type="checkbox"/> DK Dänemark | <input type="checkbox"/> RU Russische Föderation |
| <input type="checkbox"/> EE Estland | <input type="checkbox"/> SD Sudan |
| <input type="checkbox"/> ES Spanien | <input type="checkbox"/> SE Schweden |
| <input type="checkbox"/> FI Finnland | <input type="checkbox"/> SG Singapur |
| <input type="checkbox"/> GB Vereinigtes Königreich | <input type="checkbox"/> SI Slowenien |
| <input type="checkbox"/> GD Grenada | <input type="checkbox"/> SK Slowakei |
| <input type="checkbox"/> GE Georgien | <input type="checkbox"/> SL Sierra Leone |
| <input type="checkbox"/> GH Ghana | <input type="checkbox"/> TJ Tadschikistan |
| <input type="checkbox"/> GM Gambia | <input type="checkbox"/> TM Turkmenistan |
| <input type="checkbox"/> HR Kroatien | <input type="checkbox"/> TR Türkei |
| <input type="checkbox"/> HU Ungarn | <input type="checkbox"/> TT Trinidad und Tobago |
| <input type="checkbox"/> ID Indonesien | <input type="checkbox"/> UA Ukraine |
| <input type="checkbox"/> IL Israel | <input type="checkbox"/> UG Uganda |
| <input type="checkbox"/> IN Indien | <input checked="" type="checkbox"/> US Vereinigte Staaten von Amerika |
| <input type="checkbox"/> IS Island | |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan | <input type="checkbox"/> UZ Usbekistan |
| <input type="checkbox"/> KE Kenia | <input type="checkbox"/> VN Vietnam |
| <input type="checkbox"/> KG Kirgisistan | <input type="checkbox"/> YU Jugoslawien |
| <input type="checkbox"/> KP Demokratische Volksrepublik Korea | <input type="checkbox"/> ZW Simbabwe |
| <input type="checkbox"/> KR Republik Korea | Kästchen für die Bestimmung von Staaten (für die Zwecke eines nationalen Patents), die dem PCT nach der Veröffentlichung dieses Formblatts beigetreten sind: |
| <input type="checkbox"/> KZ Kasachstan | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> LC Saint Lucia | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> LK Sri Lanka | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> LR Liberia | <input type="checkbox"/> |

Erklärung bzgl. vorsorglicher Bestimmungen: Zusätzlich zu den oben genannten Bestimmungen nimmt der Anmelder nach Regel 4.9 Absatz b auch alle anderen nach dem PCT zulässigen Bestimmungen vor mit Ausnahme der im Zusatzfeld genannten Bestimmungen, die von dieser Erklärung ausgenommen sind. Der Anmelder erklärt, daß diese zusätzlichen Bestimmungen unter dem Vorbehalt einer Bestätigung stehen und jede zusätzliche Bestimmung, die vor Ablauf von 15 Monaten ab dem Prioritätsdatum nicht bestätigt wurde, nach Ablauf dieser Frist als vom Anmelder zurückgenommen gilt. (Die Bestätigung einer Bestimmung erfolgt durch die Einreichung einer Mitteilung, in der diese Bestimmung angegeben wird, und die Zahlung der Bestimmungs- und der Bestätigungsgebühr. Die Bestätigung muß beim Anmeldeamt innerhalb der Frist von 15 Monaten eingehen.)

Feld Nr. VI PRIORITÄTSANSCHEIDUNG		<input type="checkbox"/> Weitere Prioritätsansprüche sind im Zusatzfeld angegeben.		
Anmeldedatum der früheren Anmeldung (Tag/Monat/Jahr)	Aktenzeichen der früheren Anmeldung	Ist die frühere Anmeldung eine:		
		nationale Anmeldung: Staat	regionale Anmeldung: regionales Amt	internationale Anmeldung: Anmeldeamt
Zeile (1) (27.3.98) 27. März 1998	198 13 760.5	DE		
Zeile (2) (26.3.99) (26. März 1999)	noch nicht bekannt			EP
Zeile (3)				

☐ Das Anmeldeamt wird ersucht, eine beglaubigte Abschrift der oben in der (den) Zeile(n) bezeichneten früheren Anmeldung(en) zu erstellen und dem internationalen Büro zu übermitteln (nur falls die frühere Anmeldung(en) bei dem Amt eingereicht worden ist(sind), das für die Zwecke dieser internationalen Anmeldung Anmeldeamt ist)

* Falls es sich bei der früheren Anmeldung um eine ARIPO-Anmeldung handelt, so muß in dem Zusatzfeld mindestens ein Staat angegeben werden, der Mitgliedstaat der Pariser Verbandsübereinkunft zum Schutz des gewerblichen Eigentums ist und für den die frühere Anmeldung eingereicht wurde.

Feld Nr. VII INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE

Wahl der internationalen Recherchenbehörde (ISA) (falls zwei oder mehr als zwei internationale Recherchenbehörden für die Ausführung der internationalen Recherche zuständig sind, geben Sie die von Ihnen gewählte Behörde an; der Zweibuchstaben-Code kann benutzt werden):	Antrag auf Nutzung der Ergebnisse einer früheren Recherche; Bezugnahme auf diese frühere Recherche (falls eine frühere Recherche bei der internationalen Recherchenbehörde beantragt oder von ihr durchgeführt worden ist):
ISA / EP	Datum (Tag/Monat/Jahr) Aktenzeichen Staat (oder regionales Amt)

Feld Nr. VIII KONTROLLISTE; EINREICHUNGSSPRACHE

Diese internationale Anmeldung enthält die folgende Anzahl von Blättern:	Dieser internationalen Anmeldung liegen die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei:
Antrag : 3	1. <input type="checkbox"/> Blatt für die Gebührenberechnung
Beschreibung (ohne Sequenzprotokollteil) : 26	2. <input type="checkbox"/> Gesonderte unterzeichnete Vollmacht
Ansprüche : 5	3. <input type="checkbox"/> Kopie der allgemeinen Vollmacht; Aktenzeichen (falls vorhanden):
Zusammenfassung : 1	4. <input type="checkbox"/> Begründung für das Fehlen einer Unterschrift
Zeichnungen : 8	5. <input type="checkbox"/> Prioritätsbeleg(e), in Feld Nr. VI durch folgende Zeilennummer gekennzeichnet:
Sequenzprotokollteil der Beschreibung :	6. <input type="checkbox"/> Übersetzung der internationalen Anmeldung in die folgende Sprache:
Blattzahl insgesamt : 43	7. <input type="checkbox"/> Gesonderte Angaben zu hinterlegten Mikroorganismen oder anderem biologischen Material
	8. <input type="checkbox"/> Protokoll der Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenzen in computerlesbarer Form
	9. <input type="checkbox"/> Sonstige (einzeln auführen):

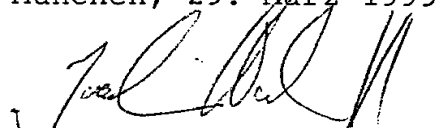
Abbildung der Zeichnungen, die mit der Zusammenfassung veröffentlicht werden soll (Nr.):	Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht wird: Deutsch
--	--

Feld Nr. IX UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS ODER DES ANWALTS

Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht eindeutig aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.

München, 29. März 1999

Wa/elh


Dr. Joachim Wachenfeld
European Patent Attorney

VOSSIUS & PARTNER
PATENTANWÄLTE
SIEBERTSTR. 4
81675 MÜNCHEN

1. Datum des tatsächlichen Eingangs dieser internationalen Anmeldung:		2. Zeichnungen <input type="checkbox"/> eingegangen: <input type="checkbox"/> nicht eingegangen:
3. Geändertes Eingangsdatum aufgrund nachträglich, jedoch fristgerecht eingegangener Unterlagen oder Zeichnungen zur Vervollständigung dieser internationalen Anmeldung:		
4. Datum des fristgerechten Eingangs der angeforderten Richtigstellungen nach Artikel 11(2) PCT:		
5. Internationale Recherchenbehörde (falls zwei oder mehr zuständig sind): ISA /	6. <input type="checkbox"/> Übermittlung des Recherchenexemplars bis zur Zahlung der Recherchegebühr aufgeschoben	

Vom Internationalen Büro auszufüllen
Datum des Eingangs des Aktenexemplars beim Internationalen Büro:

PCT

BLATT FÜR DIE GEBÜHRENBERECHNUNG

Anhang zum Antrag

Von Anmeldeamt auszufüllen

Internationales Aktenzeichen

Eingangsstempel des Anmeldeamts

Aktenzeichen des Anmelders
oder Anwalts

D 1226 PCT/a

Anmelder

MULTHOFF, Gabriele

BERECHNUNG DER VORGESCHRIEBENEN GEBÜHREN

1. ÜBERMITTLUNGSGEBÜHR EUR 102.00 T

2. RECHERCHENGEBÜHR EUR 1.124.00 S

Die internationale Recherche ist durchzuführen von EP
(Sind zwei oder mehr Internationale Recherchenbehörden für die internationale Recherche zuständig,
ist der Name der Behörde anzugeben, die die internationale Recherche durchführen soll.)

3. INTERNATIONALE GEBÜHR

Grundgebühr

Die internationale Anmeldung enthält 43 Blätter.

umfaßt die ersten 30 Blätter EUR 413.00 b1

13 x 10 = EUR 130.00 b2

Anzahl der Blätter Zusatzblattgebühr
über 30

Addieren Sie die in Feld b1 und b2 eingetragenen
Beträge, und tragen Sie die Summe in Feld B ein EUR 543.00 B

Bestimmungsgebühren

Die internationale Anmeldung enthält 4 Bestimmungen.

4 x 95 = EUR 380.00 D

Anzahl der zu zahlenden Bestimmungsgebühr

Bestimmungsgebühren (maximal 10)

Addieren Sie die in Feld B und D eingetragenen
Beträge, und tragen Sie die Summe in Feld I ein EUR 923.00 I

(Anmelder aus einigen Staaten haben Anspruch auf eine Ermäßigung der internationalen Gebühr um 75%.
Hat der Anmelder (oder haben alle Anmelder) einen solchen Anspruch, so beträgt der in Feld I einzutragende
Gesamtbeitrag 25% der Summe der in Feld B und D eingetragenen Beträge.)

4. GEBÜHR FÜR PRIORITÄTSBELEG (ggf.) P

5. GESAMTBETRAG DER ZU ZAHLENDEN GEBÜHREN

Addieren Sie die in Feldern T, S, I und P eingetragenen Beträge,
und tragen Sie die Summe in das nebenstehende Feld ein EUR 2.149.00
INSGESAMT

☐ Die Bestimmungsgebühren werden jetzt noch nicht gezahlt.

ZAHLUNGSWEISE

- ☒ Abbuchungsauftrag (siehe unten) ☐ Bankwechsel ☐ Kupons
☐ Scheck ☐ Barzahlung ☐ Sonstige (einzeln angeben):
☐ Postanweisung ☐ Gebührenmarken

ABBUCHUNGSAUFTRAG (diese Zahlungsweise gibt es nicht bei allen Anmeldeämtern)

Das Anmeldeamt/ EP ☒ wird beauftragt, den vorstehend angegebenen Gesamtbetrag der Gebühren von meinem laufenden Konto
abzubuchen.

☒ (dieses Kästchen darf nur angekreuzt werden, wenn die Vorschriften des Anmeldeamts über laufende
Konten dieses Verfahren erlauben) wird beauftragt, Fehlbeträge oder Überzahlungen des vorstehend
angegebenen Gesamtbetrags der Gebühren meinem laufenden Konto zu belasten bzw. gutzuschreiben.

☒ wird beauftragt, die Gebühr für die Ausstellung des Prioritätsbelegs und seine Übermittlung an das
Internationale Büro der WIPO von meinem laufenden Konto abzubuchen.

2800.0321

26. April 1999

Kontonummer

Datum (Tag/Monat/Jahr) Wa/elh

Dr. Joachim Wachenfeld

Unterschrift European Patent Attorney

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

Absender: MIT DER INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNG BEAUFTRAGTE BEHÖRDE

An:

VOSSIUS & PARTNER
VOSSIUS & PARTNER
Siebertstrasse 4
D-81675 München
ALLEMAGNE

EINGEGANGEN
Vossius & Partner

22. Feb. 2000

Frist 21.5.
bearb. 21.4.72

PCT

SCHRIFTLICHER BESCHEID
(Regel 66 PCT)

Absendedatum
(Tag/Monat/Jahr)

21.02.2000

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts

D 1226 PCT/a

ANTWORT FÄLLIG innerhalb von **3 Monat(en)**
ab obigem Absendedatum

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP99/02165

Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)

29/03/1999

Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)

27/03/1998

Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK

A61K38/17

Anmelder

MULTHOFF, Gabriele

1. Dieser Bescheid ist der **erste** schriftliche Bescheid der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde

2. Dieser Bescheid enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Bescheides
- II ☐ Priorität
- III ☒ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Regel 66.2(a)(ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☒ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☒ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

3. Der Anmelder wird **aufgefordert**, zu diesem Bescheid **Stellung zu nehmen**

Wann? Siehe oben genannte Frist. Der Anmelder kann vor Ablauf dieser Frist bei der Behörde eine Verlängerung beantragen, siehe Regel 66.2 d).

Wie? Durch Einreichung einer schriftlichen Stellungnahme und gegebenenfalls von Änderungen nach Regel 66.3. Zu Form und Sprache der Änderungen, siehe Regeln 66.8 und 66.9.

Dazu: Hinsichtlich einer zusätzlichen Möglichkeit zur Einreichung von Änderungen, siehe Regel 66.4.
Hinsichtlich der Verpflichtung des Prüfers, Änderungen und/oder Gegenvorstellungen zu berücksichtigen, siehe Regel 66.4 bis.
Hinsichtlich einer formlosen Erörterung mit dem Prüfer, siehe Regel 66.6.

Wird keine Stellungnahme eingereicht, so wird der internationale vorläufige Prüfungsbericht auf der Grundlage dieses Bescheides erstellt.

4. Der Tag, an dem der internationale vorläufige Prüfungsbericht gemäß Regel 69.2 spätestens erstellt sein muß, ist der: 27/07/2000.

Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragte Behörde:



Europäisches Patentamt
D-80298 München
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Bevollmächtigter Bediensteter / Prüfer

Markopoulos, E.

Formalsachbearbeiter (einschl. Fristverlängerung)
Hundt, D
Tel. +49 89 2399 2879



I. Grundlage des Bescheids

1. Dieser Bescheid wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Bescheids als "ursprünglich eingereicht".*):

Beschreibung, Seiten:

1-26 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-30 ursprüngliche Fassung

Zeichnungen, Blätter:

1-8 ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

3. Dieser Bescheid ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

Folgende Teile der Anmeldung wurden und werden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erfinderischer Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

- ☐ die gesamte internationale Anmeldung,
- ☒ Ansprüche Nr. 18-23, 29-30 in respect of industrial applicability.

Begründung:

- ☒ Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. 18-23, 29-30 beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):

siehe Beiblatt

- ☐ Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie bitte nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):
- ☐ Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.
- ☐ Für die obengenannten Ansprüche Nr. wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.

V. Begründete Feststellung nach Regel 66.2(a)(ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ansprüche	1-17, 19-28
Erfinderische Tätigkeit (IS)	Ansprüche	1-30
Gewerbliche Anwendbarkeit (IA)	Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen:

siehe Beiblatt

VI. Bestimmte angeführte Unterlagen

1. Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)

und / oder

2. Nicht-schriftliche Offenbarungen (Regel 70.9)

siehe Beiblatt

VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:

siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:

siehe Beiblatt

Zu Punkt III

Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

Die Ansprüche 18-23 und 29-30 beziehen sich auf einen Gegenstand, der nach Auffassung dieser Behörde unter die Regel 67.1 (iv) PCT fällt. Daher wird über die gewerbliche Anwendbarkeit des Gegenstands dieser Ansprüche kein Gutachten erstellt (Artikel 34(4) a) (i) PCT).

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Regel 66.2(a)(ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

- D1: G. MULTHOFF ET AL.: 'The role of heat shock proteins in the stimulation of an immune response.' BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 379, Nr. 3, März 1998 (1998-03), Seiten 295-300, XP002118462 in der Anmeldung erwähnt
- D2: Y. TAMURA ET AL.: 'Immunotherapy of tumors with autologous tumor-derived heat shock protein preparations.' SCIENCE, Bd. 278, Nr. 5335, 3. Oktober 1997 (1997-10-03), Seiten 117-120, XP002118457 Washington, DC, USA in der Anmeldung erwähnt
- D3: H. UDONO ET AL.: 'Comparison of tumor-specific immunogenicities of stress-induced proteins gp96, hsp90, and hsp70.' THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, Bd. 152, Nr. 11, 1. Juni 1994 (1994-06-01), Seiten 5398-5403, XP002118460 Baltimore, MD, USA

2. D1 offenbart die Aktivität von Hsp70, eine Immunantwort zu induzieren, wodurch die Lyse von Tumorzellen durch NK-Zellen erhöht wird. Es konnte gezeigt werden, daß Hsp70 verstärkt auf der Zelloberfläche von Sarcoma- und Lymphomazellen exprimiert wird und direkt mit der Immunantwort in Zusammenhang steht (S. 297, Sp. 2, Z. 54 - S. 298, Sp. 1, Z. 7). Auch D2 und D3 beschreiben die Wirksamkeit von Hitzeschockproteinen bei der

Bekämpfung von Tumoren, wobei Hsp aus autologen Tumoren gewonnen werden und mit Peptiden komplexiert sind.

Da durch die Formulierung des Anspruchs 1 und 2 alle Hsp70-Präparationen, also auch nicht-isolierte, beispielsweise mit Peptiden komplexierte, und tumorabhängige Hsp70-Proteine in den Schutzbereich der Ansprüche fallen, können die Ansprüche 1-6 in Anbetracht von D2 und D3 nicht als neu anerkannt werden. Hsp70 kann, muß aber nicht alleiniger Wirkstoff im herzustellenden Arzneimittel sein. Desweiteren umfaßt "Derivat" auch die komplexierten Hsp70-Proteine.

Aus demselben Grund sind auch die Ansprüche 24-28 nicht neu. Das Wort "enthält" schließt andere Wirk- oder Nebenstoffe nicht aus, somit sind auch die an Peptiden gebundenen Hsp70-Proteine nicht ausgeschlossen.

In diesem Zusammenhang ist unklar, was laut D3 unter den gereinigten Hsps zu verstehen ist, und ob nicht doch nicht-komplexierte "reine" Hsps gemeint sind (S. 5400, Sp. 1, Z. 2-4).

Die Ansprüche 7-23 und 29-30 sind auf ein Verfahren zur Aktivierung von NK-Zellen und deren Verwendung gerichtet. Wie für die Ansprüche 1-6 gelten auch für Ansprüche 7-17 und 19-23 dieselben Einwände mutandis mutandi (besonders im Lichte von D2 in Bezug auf die Aktivierung von T-Lymphozyten allgemein bzw. Killerzellen, S. 118, Sp. 2, Z. 9 - Sp. 3, Z. 32).

Daher erfüllen die Ansprüche 1-17 und 19-28 das in Artikel 33(2) PCT genannte Kriterium in Bezug zu Neuheit nicht.

3. Die mit der vorliegenden Erfindung zu lösende Aufgabe kann darin gesehen werden, daß der therapeutische Einsatz von Hsp70-Protein viel universeller und einfacher erfolgt und nicht abhängig vom jeweiligen Tumormaterial ist. Indem die Wirkung von isoliertem Hsp70 gezeigt wird, wird auch das technische Vorurteil, daß isolierte Hitzeschockproteine bzw. nicht mit Peptiden komplexierte keine immunogenen Wirkungen mehr aufweisen (D3: S. 5402, Sp. 1, Z. 10-35), beseitigt.

Die in den Ansprüchen 18 und 29-30 der vorliegenden Anmeldung für diese Aufgabe vorgeschlagene Lösung scheint nicht auf einer erfinderischen Tätigkeit zu beruhen (Artikel 33(3) PCT), da die Aktivierung von Killerzellen in der Tumorthherapie für den Fachmann offensichtlich ist.

Falls für die Ansprüche 1-17 und 19-28 Neuheit wieder hergestellt werden kann und außerdem gezeigt werden kann, daß die in D3 verwendeten Präparationen ausschließlich mit Peptiden komplexierte Hsp70-Proteine sind, würde eine erfinderische Tätigkeit anerkannt werden.

4. Für die Beurteilung der Frage, ob die Gegenstände der vorliegenden Ansprüche 18-23 und 29-30 gewerblich anwendbar sind, gibt es in den PCT-Vertragsstaaten keine einheitlichen Kriterien. Die Patentierbarkeit kann auch von der Formulierung der Ansprüche abhängen. Das EPA beispielsweise erkennt den Gegenstand von Ansprüchen, die auf die medizinische Anwendung einer Verbindung gerichtet sind, nicht als gewerblich anwendbar an; es können jedoch Ansprüche zugelassen werden, die auf eine bekannte Verbindung zur erstmaligen medizinischen Anwendung und die Verwendung einer solchen Verbindung zur Herstellung eines Arzneimittels für eine neue medizinische Anwendung gerichtet sind.

Zu Punkt VI

Bestimmte angeführte Unterlagen

Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)

Anmelde Nr. Patent Nr.	Veröffentlichungsdatum (Tag/Monat/Jahr)	Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)	Prioritätsdatum (zu Recht beansprucht) (Tag/Monat/Jahr)
EP-A-843 005	20. Mai 1998	13. Nov. 1997	15. Nov. 1996

Zu Punkt VII

Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Die Angaben in Klammern in den Ansprüchen 1, 2, 7, 18, 19, 20 und 24 macht diese Ansprüche unklar, da nicht erkenntlich ist, ob dieses Merkmal die Ansprüche einschränken soll.

Zu Punkt VIII

Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

1. Die Ansprüche 20 und 25 werden nicht, wie in Artikel 6 PCT vorgeschrieben, durch die Beschreibung gestützt, da ihr Umfang über den durch die Beschreibung gerechtfertigten Umfang hinausgeht. Die Gründe dafür sind die folgenden: "Autoimmunerkrankungen" werden an keiner Stelle in der Beschreibung erwähnt, und die Konzentrationsangabe 10µg/ml in Anspruch 25 deckt sich nicht mit derjenigen auf S. 14 der Beschreibung.

2. Die Ansprüche 5, 6, 11, 12 sind nicht klar und erfüllen die Erfordernisse des Artikels 6 PCT insofern nicht, als der Gegenstand des Schutzbegehrens nicht klar definiert ist. Mit der funktionellen Angabe "Zellen von Patienten mit Infektionskrankheiten" sind prinzipiell alle Zellen des Patienten gemeint, was laut den o.g. Ansprüchen zu einer gesteigerten zytolytischen Aktivität aller Zellen führt.

3. Der abhängige Anspruch 17 ist nicht in Einklang mit den Ansprüchen 15 und 16, da laut Anspruch 15 "zusätzlich ein Zytokin eingesetzt wird", und laut Anspruch 17 die Möglichkeit besteht, 3 verschiedene Interleukine gleichzeitig einzusetzen. Dieser Widerspruch zwischen den Ansprüchen führt zu Zweifeln bezüglich des Gegenstandes des Schutzbegehrens, weshalb die Ansprüche nicht klar sind (Artikel 6 PCT).

PCTWORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification ⁶ : A61K 39/385, 39/12, 39/02, 39/00, 35/12, G01N 33/53, 33/555, 33/567	A1	(11) International Publication Number: WO 97/10001 (43) International Publication Date: 20 March 1997 (20.03.97)
(21) International Application Number: PCT/US96/14557 (22) International Filing Date: 11 September 1996 (11.09.96) (30) Priority Data: 527,391 13 September 1995 (13.09.95) US (71) Applicant: FORDHAM UNIVERSITY [US/US]; 441 East Fordham Road, Bronx, NY 10458 (US). (72) Inventor: SRIVASTAVA, Pramod, K.; 4601 Henry Hudson Parkway, Riverdale, NY 10471 (US). (74) Agents: ANTLER, Adriane, M. et al.; Pennie & Edmonds, 1155 Avenue of the Americas, New York, NY 10036 (US).	(81) Designated States: AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CU, CZ, EE, FI, GE, HU, IL, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UZ, VN, ARIPO patent (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Published <i>With international search report.</i>	
(54) Title: TREATMENT OR PREVENTION OF NEOPLASTIC AND INFECTIOUS DISEASES WITH HEAT SHOCK/STRESS PROTEINS (57) Abstract The present invention relates to methods and compositions for eliciting an immune response and the prevention and treatment of primary and metastatic neoplastic diseases and infectious diseases. The methods of the invention comprise administering a composition comprising an effective amount of a complex, in which the complex consists essentially of a heat shock protein (hsp) noncovalently bound to an antigenic molecule. "Antigenic molecule" as used herein refers to the peptides with which the hsps are endogenously associated <i>in vivo</i> as well as exogenous antigens/immunogens (i.e., with which the hsps are not complexed <i>in vivo</i> or antigenic/immunogenic fragments and derivatives thereof. In a preferred embodiment, the complex is autologous to the individual. The effective amounts of the complex are in the range of 100-600 micrograms for complexes comprising hsp70, 50-1000 micrograms for hsp90, and 10-600 micrograms for gp96. The invention also provides a method for measuring tumor rejection <i>in vivo</i> in an individual, preferably a human, comprising measuring the generation by the individual of MHC Class I-restricted CD8+ cytotoxic T lymphocytes specific to the tumor. Methods of purifying hsp70-peptide complexes are also provided.		

FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AM	Armenia	GB	United Kingdom	MW	Malawi
AT	Austria	GE	Georgia	MX	Mexico
AU	Australia	GN	Guinea	NE	Niger
BB	Barbados	GR	Greece	NL	Netherlands
BE	Belgium	HU	Hungary	NO	Norway
BF	Burkina Faso	IE	Ireland	NZ	New Zealand
BG	Bulgaria	IT	Italy	PL	Poland
BJ	Benin	JP	Japan	PT	Portugal
BR	Brazil	KE	Kenya	RO	Romania
BY	Belarus	KG	Kyrgyzstan	RU	Russian Federation
CA	Canada	KP	Democratic People's Republic of Korea	SD	Sudan
CF	Central African Republic	KR	Republic of Korea	SE	Sweden
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapore
CH	Switzerland	LI	Liechtenstein	SI	Slovenia
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovakia
CM	Cameroon	LR	Liberia	SN	Senegal
CN	China	LT	Lithuania	SZ	Swaziland
CS	Czechoslovakia	LU	Luxembourg	TD	Chad
CZ	Czech Republic	LV	Latvia	TG	Togo
DE	Germany	MC	Monaco	TJ	Tajikistan
DK	Denmark	MD	Republic of Moldova	TT	Trinidad and Tobago
EE	Estonia	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Spain	ML	Mali	UG	Uganda
FI	Finland	MN	Mongolia	US	United States of America
FR	France	MR	Mauritania	UZ	Uzbekistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

"TREATMENT OR PREVENTION OF NEOPLASTIC AND INFECTIOUS DISEASES WITH HEAT SHOCK/STRESS PROTEINS"

This invention was made with government support under
5 grant numbers CA44786 and CA64394 awarded by the National
Institutes of Health. The government has certain rights in
the invention.

1. INTRODUCTION

The present invention relates to methods and
10 compositions for the prevention and treatment of infectious
diseases, primary and metastatic neoplastic diseases,
including, but not limited to human sarcomas and carcinomas.
In the practice of the prevention and treatment of infectious
diseases and cancer, compositions of complexes of heat
15 shock/stress proteins (hsps) including, but not limited to,
hsp70, hsp90, gp96 alone or in combination with each other,
noncovalently bound to antigenic molecules, are used to
augment the immune response to genotoxic and nongenotoxic
factors, tumors and infectious agents.

20

2. BACKGROUND OF THE INVENTION

The era of tumor immunology began with experiments by
Prehn and Main, who showed that antigens on the
methylcholanthrene (MCA)-induced sarcomas were tumor specific
25 in that transplantation assays could not detect these
antigens in normal tissue of the mice (Prehn, R.T., et al.,
1957, *J. Natl. Cancer Inst.* 18:769-778). This notion was
confirmed by further experiments demonstrating that tumor
specific resistance against MCA-induced tumors can be
30 elicited in the autochthonous host, that is, the mouse in
which the tumor originated (Klein, G., et al., 1960, *Cancer
Res.* 20:1561-1572).

In subsequent studies, tumor specific antigens were also
found on tumors induced with other chemical or physical
35 carcinogens or on spontaneous tumors (Kripke, M.L., 1974, *J.
Natl. Cancer Inst.* 53:1333-1336; Vaage, J., 1968, *Cancer Res.*

28:2477-2483; Carswell, E.A., et al., 1970, *J. Natl. Cancer Inst.* 44:1281-1288). Since these studies used protective immunity against the growth of transplanted tumors as the criterion for tumor specific antigens, these antigens are also commonly referred to as "tumor specific transplantation antigens" or "tumor specific rejection antigens." Several factors can greatly influence the immunogenicity of the tumor induced, including, for example, the specific type of carcinogen involved, immunocompetence of the host and latency period (Old, L.J., et al., 1962, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 101:80-106; Bartlett, G.L., 1972, *J. Natl. Cancer Inst.* 49:493-504).

Most, if not all, carcinogens are mutagens which may cause mutation, leading to the expression of tumor specific antigens (Ames, B.N., 1979, *Science* 204:587-593; Weisburger, J.H., et al., 1981, *Science* 214:401-407). Some carcinogens are immunosuppressive (Malmgren, R.A., et al., 1952, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 79:484-488). Experimental evidence suggests that there is a constant inverse correlation between immunogenicity of a tumor and latency period (time between exposure to carcinogen and tumor appearance) (Old, L.J., et al., 1962, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 101:80-106; and Bartlett, G.L., 1972, *J. Natl. Cancer Inst.* 49:493-504). Other studies have revealed the existence of tumor specific antigens that do not lead to rejection, but, nevertheless, can potentially stimulate specific immune responses (Roitt, I., Brostoff, J and Male, D., 1993, *Immunology*, 3rd ed., Mosby, St. Louis, pps. 17.1-17.12).

**2.1. Tumor-Specific Immunogenicities
of Heat Shock/Stress Proteins
hsp70, hsp90 and gp96**

Srivastava et al. demonstrated immune response to methylcholanthrene-induced sarcomas of inbred mice (1988, *Immunol. Today* 9:78-83). In these studies it was found that the molecules responsible for the individually distinct immunogenicity of these tumors were identified as cell-surface glycoproteins of 96kDa (gp96) and intracellular

proteins of 84 to 86kDa (Srivastava, P.K., et al., 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:3407-3411; Ullrich, S.J., et al., 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:3121-3125. Immunization of mice with gp96 or p84/86 isolated from a particular tumor rendered the mice immune to that particular tumor, but not to antigenically distinct tumors. Isolation and characterization of genes encoding gp96 and p84/86 revealed significant homology between them, and showed that gp96 and p84/86 were, respectively, the endoplasmic reticular and cytosolic counterparts of the same heat shock proteins (Srivastava, P.K., et al., 1988, *Immunogenetics* 28:205-207; Srivastava, P.K., et al., 1991, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 167:109-123). Further, hsp70 was shown to elicit immunity to the tumor from which it was isolated but not to antigenically distinct tumors. However, hsp70 depleted of peptides was found to lose its immunogenic activity (Udono, M., and Srivastava, P.K., 1993, *J. Exp. Med.* 178:1391-1396). These observations suggested that the heat shock proteins are not immunogenic per se, but are carriers of antigenic peptides that elicit specific immunity to cancers (Srivastava, P.K., 1993, *Adv. Cancer Res.* 62:153-177).

2.2. Pathobiology of Cancer

Cancer is characterized primarily by an increase in the number of abnormal cells derived from a given normal tissue, invasion of adjacent tissues by these abnormal cells, and lymphatic or blood-borne spread of malignant cells to regional lymph nodes and to distant sites (metastasis). Clinical data and molecular biologic studies indicate that cancer is a multistep process that begins with minor preneoplastic changes, which may under certain conditions progress to neoplasia.

Pre-malignant abnormal cell growth is exemplified by hyperplasia, metaplasia, or most particularly, dysplasia (for review of such abnormal growth conditions, see Robbins and Angell, 1976, *Basic Pathology*, 2d Ed., W.B. Saunders Co., Philadelphia, pp. 68-79.) Hyperplasia is a form of

controlled cell proliferation involving an increase in cell number in a tissue or organ, without significant alteration in structure or function. As but one example, endometrial hyperplasia often precedes endometrial cancer. Metaplasia is
5 a form of controlled cell growth in which one type of adult or fully differentiated cell substitutes for another type of adult cell. Metaplasia can occur in epithelial or connective tissue cells. Atypical metaplasia involves a somewhat disorderly metaplastic epithelium. Dysplasia is frequently a
10 forerunner of cancer, and is found mainly in the epithelia; it is the most disorderly form of non-neoplastic cell growth, involving a loss in individual cell uniformity and in the architectural orientation of cells. Dysplastic cells often have abnormally large, deeply stained nuclei, and exhibit
15 pleomorphism. Dysplasia characteristically occurs where there exists chronic irritation or inflammation, and is often found in the cervix, respiratory passages, oral cavity, and gall bladder.

The neoplastic lesion may evolve clonally and develop an
20 increasing capacity for invasion, growth, metastasis, and heterogeneity, especially under conditions in which the neoplastic cells escape the host's immune surveillance (Roitt, I., Brostoff, J and Kale, D., 1993, Immunology, 3rd ed., Mosby, St. Louis, pps. 17.1-17.12).

25

2.3. Immunotherapy

Four basic cell types whose function has been associated with antitumor cell immunity and the elimination of tumor cells from the body are: i) B-lymphocytes which secrete
30 immunoglobulins into the blood plasma for identifying and labeling the nonself invader cells; ii) monocytes which secrete the complement proteins which are responsible for lysing and processing the immunoglobulin-coated target invader cells; iii) natural killer lymphocytes having two
35 mechanisms for the destruction of tumor cells-antibody-dependent cellular cytotoxicity and natural killing; and iv) T-lymphocytes possessing antigen-specific receptors and each

T-lymphocyte clone having the capacity to recognize a tumor cell carrying complementary marker molecules (Schreiber, H., 1989, in *Fundamental Immunology* (ed). W.E. Paul, pp. 923-955).

5 Several factors can influence the immunogenicity of tumors induced. These factors include dose of carcinogen, immunocompetence of the host, and latency period. Immunocompetence of the host during the period of cancer induction and development can allow the host to respond to
10 immunogenic tumor cells. This may prevent the outgrowth of these cells or select far less immunogenic escape variants that have lost their respective rejection antigen. Conversely, immunosuppression or immune deficiency of the host during carcinogenesis or tumorigenesis may allow growth
15 of highly immunogenic tumors (Schreiber, H., 1989, in *Fundamental Immunology* (ed). W.E. Paul, pp. 923-955).

Three major types of cancer immunotherapy are currently being explored: i) adoptive cellular immunotherapy, ii) in vivo manipulation of patient plasma to remove blocking
20 factors or add tumoricidal factors, and iii) in vivo administration of biological response modifiers (e.g., interferons (IFN; IFN-alpha and IFN-gamma), interleukins (IL; IL-2, IL-4 and IL-6), colony-stimulating factors, tumor necrosis factor (TNF), monoclonal antibodies and other
25 immunopotentiating agents, such as corynebacterium parvum (C. parvum) (Kopp, W.C., et al., 1994, *Cancer Chemotherapy and Biol. Response Modifiers* 15:226-286). There is little doubt that immunotherapy of cancer as it stands is falling short of the hopes invested in it. Although numerous
30 immunotherapeutic approaches have been tested, few of these procedures have proved to be effective as the sole or even as an adjunct form of cancer prevention and treatment.

2.3.1. Interleukins (IL-2, IL-4 and IL-6)

35 IL-2 has significant antitumor activity in a small percentage of patients with renal cell carcinoma and melanoma. Investigators continue to search for IL-2 based

regimens that will increase the response rates in IL-2 responsive tumors, but, for the most part, have neither defined new indications nor settled fundamental issues, such as whether dose intensity is important in IL-2 therapy (Kopp, W.C., et al., 1994, *Cancer Chemotherapy and Biol. Response Modifiers* 15:226-286). Numerous reports have documented IL-2 associated toxicity involving increased nitrate levels and the syndrome of vascular leak and hypotension, analogous to septic shock. In addition, an increased incidence of nonopportunistic bacterial infections and autoimmune complications are frequently accompanied by the antitumor response of IL-2 (Kopp, W.C., et al., 1994, *Cancer Chemotherapy and Biol. Response Modifiers* 15:226-286).

IL-4 and IL-6 are also being tested as antitumor agents either directly or through immunomodulating mechanisms. Dose-limiting toxicities have been observed with both agents in Phase I clinical trials (Gilleece, M.H., et al., 1992, *Br. J. Cancer* 66:204-210, Weber, J., et al., 1993, *J. Clin. Oncol.* 11:499-506).

2.3.2. Tumor Necrosis Factor

The toxicity of systemically administered TNF seriously limits its use for the treatment of cancer. TNF has been most effective when used for regional therapy, in which measures, such as limb isolation for perfusion, are taken to limit the systemic dose and hence the toxicity of TNF. Dose-limiting toxicity of TNF consist of thrombocytopenia, headache, confusion and hypotension (Mittleman, A., et al., 1992, *Inv. New Drugs* 10:183-190).

2.3.3. Interferons

The activity of IFN- α has been described as being modest in a number of malignancies, including renal cell carcinoma, melanoma, hairy cell leukemia low-grade non-Hodgkin's lymphoma, and others. Higher doses of IFN- α are usually associated with higher response rates in some malignancies, but also cause more toxicity. In addition, more and more

reports indicate that relapses after successful interferon therapy coincide with formation of neutralizing antibodies against interferon (Ouesada, J.R., et al., 1987, *J. Interferon Res.* 67:678.

5

2.4. Pharmacokinetic Models for Anticancer Chemotherapeutic and Immunotherapeutic Drugs: Extrapolation and Scaling of Animal Data to Humans

The ethical and fiscal constraints which require the use of animal models for most toxicology research also impose the acceptance of certain fundamental assumptions in order to estimate dose potency in humans from dose-response data in animals. Interspecies dose-response equivalence is most frequently estimated as the product of a reference species dose and a single scaling ratio based on a physiological parameter such as body weight, body surface area, maximum lifespan potential, etc. Most frequently, exposure is expressed as milligrams of dose administered in proportion to body mass in kilograms (mg kg^{-1}). Body mass is a surrogate for body volume, and therefore, the ratio milligrams per kilogram is actually concentrations in milligrams per liter (Hirshaut, Y., et al., 1969, *Cancer Res.* 29:1732-1740). The key assumptions which accompany this practice and contribute to its failure to accurately estimate equipotent exposure among various species are: i) that the biological systems involved are homogeneous, "well-stirred volumes" with specific gravity equal to 1.0; ii) that the administered compounds are instantly and homogeneously distributed throughout the total body mass; and iii) that the response of the biological systems is directly proportional only to the initial concentration of the test material in the system. As actual pharmacokinetic conditions depart from these assumptions, the utility of initial concentration scaling between species declines.

Through pharmacokinetics, one can study the time course of a drug and its metabolite levels in different fluids, tissues, and excreta of the body, and the mathematical

relationships required to develop models to interpret such data. It, therefore, provides the basic information regarding drug distribution, availability, and the resulting toxicity in the tissues and hence, specifies the limitation
5 in the drug dosage for different treatment schedules and different routes of drug administration. The ultimate goal of the pharmacokinetic studies of anticancer drugs is thus to offer a framework for the design of optimal therapeutic dosage regimens and treatment schedules for individual
10 patients.

The currently utilized guidelines for prescription have evolved gradually without always having a complete and explicit justification. In 1966, Freireich and co-workers proposed the use of surface area proportions for interspecies
15 extrapolation of the acute toxicity of anticancer drugs. This procedure has become the method of choice for many risk assessment applications (Freireich, E.J., et al., 1966, *Cancer Chemotherapy Rep.* 50:219-244). For example, surface area scaling is the basis of the National Cancer Institute's
20 interspecies extrapolation procedure for anti-cancer drugs (Schein, P.S., et al., 1970, *Clin. Pharmacol. Therap.* 11:3-40; Goldsmith, M.A., et al., 1975, *Cancer Res.* 35:1354-1364). In accepting surface area extrapolation, the tenuous basis for initial concentration scaling has been replaced by an
25 empirical approach. The basic formula used for estimating prescription of cancer chemotherapy per body surface area (BSA) is $BSA = k \times kg^{2/3}$, in which k is a constant that differs for each age group and species. For example, the k value for adult humans is 11, while for mice it is 9 (See Quiring, P.,
30 1955, *Surface area determination*, in Glasser E. (ed.) *Medical Physics I* Chicago: Medical Year Book, p. 1490 and Vriesendorp, H.M., 1985, *Hematol. (Supplm. 16)* 13:57-63). The major attraction of expressing cancer chemotherapy per m² BSA appears to be that it offers an easily remembered
35 simplification, i.e., equal doses of drug per m² BSA will produce approximately the same effect in comparing different species and age groups. However, simplicity is not proof and

alternative methods for estimating prescription of anticancer drugs appear to have a better scientific foundation, with the added potential for a more effective use of anticancer agents (Hill, J.A., et al., 1989, *Health Physics* 57:395-401).

5 The effectiveness of an optimal dose of a drug used in chemotherapy and/or immunotherapy can be altered by various factors, including tumor growth kinetics, drug resistance of tumor cells, total-body tumor cell burden, toxic effects of chemotherapy and/or immunotherapy on cells and tissues other
10 than the tumor, and distribution of chemotherapeutic agents and/or immunotherapeutic agents within the tissues of the patient. The greater the size of the primary tumor, the greater the probability that a large number of cells (drug resistant and drug sensitive) have metastasized before
15 diagnosis and that the patient will relapse after the primary.

Some metastases arise in certain sites in the body where resistance to chemotherapy is based on the limited tissue distribution of chemotherapeutic drugs administered in
20 standard doses. Such sites act as sanctuaries that shield the cancer cells from drugs that are circulating in the blood; for example, there are barriers in the brain and tests that impede drug diffusion from the capillaries into the tissue. Thus, these sites may require special forms of
25 treatment such as immunotherapy, especially since immunosuppression is characteristic of several types of neoplastic diseases.

3. SUMMARY OF THE INVENTION

30 The methods of the invention comprise methods of eliciting an immune response in an individual in whom the treatment or prevention of cancer is desired by administering a composition comprising an effective amount of a complex in which the complex consists essentially of a heat shock
35 protein (hsp) noncovalently bound to an antigenic molecule. The amounts of the complex are within ranges of effective dosages, discovered by the present inventor to be effective,

and which are surprisingly smaller than those amounts predicted to be effective by extrapolation by prior art methods from dosages used in animal studies. In a preferred embodiment, the complex is autologous to the individual; that
5 is, the complex is isolated from the cancer cells of the individual himself (e.g., preferably prepared from tumor biopsies of the patient). Alternatively, the hsp and or the antigenic molecule can be isolated from the individual or from others or by recombinant production methods using a
10 closed hsp originally derived from the individual or from others. "Antigenic molecule" as used herein refers to the peptides with which the hsps are endogenously associated *in vivo* (e.g., in precancerous or cancerous tissue), as well as exogenous antigens/immunogens (i.e., with which the hsps are
15 not complexed *in vivo*) or antigenic/immunogenic fragments and derivatives thereof. Such exogenous antigens and fragments and derivatives (both peptide and non-peptide) thereof for use in complexing with hsps, can be selected from among those known in the art, as well as those readily identified by
20 standard immunoassays known in the art by detecting the ability to bind antibody or MHC molecules (antigenicity) or generate immune response (immunogenicity).

The invention also provides a method for measuring tumor rejection *in vivo* in an individual, preferably a human,
25 comprising measuring the generation by the individual of MHC Class I-restricted CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes specific to the tumor.

The invention provides methods for determining doses for treating infectious diseases or for human cancer
30 immunotherapy by evaluating the optimal dose of complexes of hsps noncovalently bound to antigenic molecules in experimental tumor models and extrapolating the data. The present invention relates to methods and compositions for prevention and treatment of primary and metastatic neoplastic
35 diseases.

Specific therapeutic regimens, pharmaceutical compositions, and kits are provided by the invention. In

contrast to the prior art, the therapeutic regimen, and corresponding pharmaceutical compounds of the present invention are not based on body weight or surface area of the patient. The present inventor has discovered that a dosage substantially equivalent to that seen to be effective in smaller non-human mammals (e.g., mice) is effective for human administration, optionally subject to a correction factor not exceeding a fifty fold increase, based on the relative lymph node sizes in such mammals and in humans. Pharmaceutical formulations are provided, based on a newly-discovered extrapolation and scaling of animal dosage to human, comprising compositions of complexes of antigenic molecules and heat shock/stress proteins, including but not limited to hsp70, hsp90, gp96 either alone or in combination. Specifically, interspecies dose-response equivalence for hsp noncovalently bound to antigenic molecules for a human dose is estimated as the product of the therapeutic dosage observed in mice and a single scaling ratio, not exceeding a fifty fold increase.

The present invention encompasses methods for prevention and treatment of cancer by enhancing the host's immune competence and activity of immune effector cells. Furthermore, the invention provides methods for evaluating the efficacy of drugs in enhancing immune responses for treatment and monitoring the progress of patients participating in clinical trials for the treatment of primary and metastatic neoplastic diseases.

Immunotherapy using the therapeutic regimens of the invention, by administering such complexes of heat shock/stress proteins noncovalently bound to antigenic molecules, can induce specific immunity to tumor cells, and leads to regression of the tumor mass. Cancers which are responsive to specific immunotherapy by the heat shock/stress proteins of the invention include but are not limited to human sarcomas and carcinomas. In a specific embodiment, hsp-antigenic molecule complexes are allogeneic to the

patient; in a preferred embodiment, the hsp are autologous to (derived from) the patient to whom they are administered.

Particular compositions of the invention and their properties are described in the sections and subsections 5 which follow. A preferred composition comprises hsp-peptide complexes isolated from the tumor biopsy of the patient to whom the composition is to be administered. Such a composition which comprises hsp70, hsp90 and/or gp96 demonstrates strong inhibition of a variety of tumors in 10 mammals. Moreover, the therapeutic doses that are effective in the corresponding experimental model in rodents as described *infra*, in Section 6 can be used to inhibit the *in vivo* growth of colon and liver cancers in human cancer patients as described in Section 7, *infra*. Preferred 15 compositions comprising hsp70, hsp90 and/or gp96 which preferably exhibit no toxicity when administered to human subjects are also described.

In another embodiment, the methods further optionally comprise administering biological response modifiers, e.g., 20 IFN- α , IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6, TNF, or other cytokine growth factors affecting the immune cells, in combination with the hsp complexes.

In addition to cancer therapy, the complexes of hsps noncovalently bound to antigenic molecules can be utilized 25 for the prevention of a variety of cancers, e.g., in individuals who are predisposed as a result of familial history or in individuals with an enhanced risk to cancer due to environmental factors.

An improved method for purification of hsp70-peptide 30 complexes from cells is also provided.

The Examples presented in Sections 6 and 7 below, detail the use according to the methods of the invention of hsp-peptide complexes in cancer immunotherapy in experimental tumor models and in human patients suffering from advanced 35 colon and liver cancer.

4. BRIEF DESCRIPTION OF FIGURES

Figure 1. Effect of Administration of gp96 derived from UV6138 or UV6139SJ carcinomas on tumor growth measured as average tumor diameter (mm).

5 Panel A: Lane 1, SDS-PAGE profile of gp96 preparation; Lane 2, Immunoblot of lane 1 with antibody specific for gp96.

Panel B (top): All mice were challenged with UV6138 cells. The first group of mice (open circles) received PBS; the second group of mice (solid circles) received gp96
10 derived from UV6138 cells; and the third group of mice received gp96 derived from UV6139SJ cells.

Panel B (bottom): All mice were challenged with UV6139SJ cells. The first group of mice (open circles) received PBS; the second group of mice (solid circles) received gp96
15 derived from UV6138 cells; and the third group of mice received gp96 derived from UV6139SJ cells.

Figure 2. Effect in tumor-bearing mice of therapeutic administration of gp96 derived from UV6139SJ cells on tumor growth measured as tumor volume (mm³). All mice were
20 challenged with UV6139SJ cells. The first group of mice received no treatment, the second group received gp96 derived from UV6139SJ cells, and the third group received gp96 derived from the liver.

Figure 3. Vaccination with cognate gp96 preparations
25 elicits MHC class I - restricted CTLs. Mice were immunized with gp96 derived from UV6138 (triangles) or UV6139SJ (rectangles) or with intact tumor cells (circles), as described in legend to Fig. 1. Ten days after second immunization, spleens were removed and spleen cells were
30 cocultured in a mixed lymphocyte tumor culture (MLTC) with irradiated tumor cells used for immunization or gp96 preparation. MLTCs were tested for cytotoxicity in a chromium release assay. Open symbols refer to the cytotoxicity in presence of anti-MHC class I specific
35 antibody K44. (A) In vitro cytotoxicity of non-immunized mice (triangle) or mice immunized with 20 microgram of gp96 derived from UV6138 (circle) or UV6139SJ (rectangle) against

targets as indicated. (B) *In vitro* cytotoxicity of non-immunized mice (triangle) or mice immunized twice with 10^7 irradiated UV6138 cells (circles) or UV6139SJ cells (rectangles) against targets as indicated.

5 Figure 4. Vaccination with cognate gp96 preparations elicits radiation-resistant T cell response. Mice were immunized with gp96 derived from UV6138 (triangles) or UV6139SJ (rectangles) and MLTCs set up as described in legend to Fig. 2, except that mice had been irradiated at 400 rad
10 twelve days after the last vaccination and MLTCs were set up three days after irradiation. Open symbols refer to the cytotoxicity in presence of anti-MHC class I specific antibody K44.

 Figure 5. A. ADP-bound and ADP eluted hsp70 preparation
15 was found to be associated with peptides. B. ATP-bound and ATP eluted hsp70 preparation was found not to be associated with peptides.

5. DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

20 Methods and compositions for the prevention and treatment of primary and metastatic neoplastic diseases and infectious diseases and for eliciting an immune response in a human individual, are described. The invention is based, in part, on a newly discovered dosage regimen for administration
25 of compositions comprising complexes of hsps noncovalently bound to antigenic molecules.

 "Antigenic molecule" as used herein refers to the peptides with which the hsps are endogenously associated *in vivo* (e.g., in infected cells or precancerous or cancerous
30 tissue) as well as exogenous antigens/immunogens (i.e., with which the hsps are not complexed *in vivo*) or antigenic/immunogenic fragments and derivatives thereof.

 The methods of the invention comprise methods of eliciting an immune response in an individual in whom the
35 treatment or prevention of infectious diseases or cancer is desired by administering a composition comprising an effective amount of a complex, in which the complex consists

essentially of a hsp noncovalently bound to an antigenic molecule. In a preferred embodiment, the complex is autologous to the individual; that is, the complex is isolated from either from the infected cells or the cancer
5 cells for precancerous cells of the individual himself (e.g., preferably prepared from infected tissues or tumor biopsies of the patient). Alternatively, the complex is produced *in vitro* (e.g., wherein a complex with an exogenous antigenic molecule is desired). Alternatively, the hsp and/or the
10 antigenic molecule can be isolated from the individual or from others or by recombinant production methods using a cloned hsp originally derived from the individual or from others. Exogenous antigens and fragments and derivatives (both peptide and non-peptide) thereof for use in complexing
15 with hsps, can be selected from among those known in the art, as well as those readily identified by standard immunoassays known in the art by the ability to bind antibody or MHC molecules (antigenicity) or generate immune response (immunogenicity). Complexes of hsps and antigenic molecules
20 can be isolated from cancer or precancerous tissue of a patient, or from a cancer cell line, or can be produced *in vitro* (as is necessary in the embodiment in which an exogenous antigen is used as the antigenic molecule).

The invention also provides a method for measuring tumor
25 rejection *in vivo* in an individual, preferably a human comprising measuring the generation by the individual of MHC Class I-restricted CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes specific to the tumor.

The hsps of the present invention that can be used
30 include but are not limited to, hsp70, hsp90, gp96 alone or in combination. Preferably, the hsps are human hsps.

Heat shock proteins, which are also referred to interchangeably herein as stress proteins, useful in the practice of the instant invention can be selected from among
35 any cellular protein that satisfies any one of the following criteria. It is a protein whose intracellular concentration increases when a cell is exposed to a stressful stimuli, it

is capable of binding other proteins or peptides, it is capable of releasing the bound proteins or peptides in the presence of adenosine triphosphate (ATP) or low pH, or it is a protein showing at least 35% homology with any cellular protein having any of the above properties.

The first stress proteins to be identified were the heat shock proteins (hsps). As their name implies, hsps are synthesized by a cell in response to heat shock. To date, three major families of hsp have been identified based on molecular weight. The families have been called hsp60, hsp70 and hsp90 where the numbers reflect the approximate molecular weight of the stress proteins in kilodaltons. Many members of these families were found subsequently to be induced in response to other stressful stimuli including, but not limited to, nutrient deprivation, metabolic disruption, oxygen radicals, and infection with intracellular pathogens. (See Welch, May 1993, *Scientific American* 56-64; Young, 1990, *Annu. Rev. Immunol.* 8:401-420; Craig, 1993, *Science* 260:1902-1903; Gething, et al., 1992, *Nature* 355:33-45; and Lindquist, et al., 1988, *Annu. Rev. Genetics* 22:631-677), the disclosures of which are incorporated herein by reference. It is contemplated that hsps/stress proteins belonging to all of these three families can be used in the practice of the instant invention.

The major hsps can accumulate to very high levels in stressed cells, but they occur at low to moderate levels in cells that have been stressed. For example, the highly inducible mammalian hsp70 is hardly detectable at normal temperatures but becomes one of the most actively synthesized proteins in the cell upon heat shock (Welch, et al., 1985, *J. Cell. Biol.* 101:1198-1211). In contrast, hsp90 and hsp60 proteins are abundant at normal temperatures in most, but not all, mammalian cells and are further induced by heat (Lai, et al., 1984, *Mol. Cell. Biol.* 4:2802-10; van Bergen en Henegouwen, et al., 1987, *Genes Dev.* 1:525-31).

Heat shock proteins are among the most highly conserved proteins in existence. For example, DnaK, the hsp70 from E.

coli has about 50% amino acid sequence identity with hsp70 proteins from excoriates (Bardwell, et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:848-852). The hsp60 and hsp90 families also show similarly high levels of intra families conservation
5 (Hickey, et al., 1989, *Mol. Cell. Biol.* 9:2615-2626; Jindal, 1989, *Mol. Cell. Biol.* 9:2279-2283). In addition, it has been discovered that the hsp60, hsp70 and hsp90 families are composed of proteins that are related to the stress proteins in sequence, for example, having greater than 35% amino acid
10 identity, but whose expression levels are not altered by stress. Therefore it is contemplated that the definition of stress protein, as used herein, embraces other proteins, mureins, analogs, and variants thereof having at least 35% to 55%, preferably 55% to 75%, and most preferably 75% to 85%
15 amino acid identity with members of the three families whose expression levels in a cell are enhanced in response to a stressful stimulus. The purification of stress proteins belonging to these three families is described below.

The immunogenic hsp-peptide complexes of the invention
20 may include any complex containing an hsp and a peptide that is capable of inducing an immune response in a mammal. The peptides are preferably non covalently associated with the hsp. Preferred complexes may include, but are not limited to, hsp60-peptide, hsp70-peptide and hsp90-peptide complexes.
25 For example, an hsp called gp96 which is present in the endoplasmic reticulum of eukaryotic cells and is related to the cytoplasmic hsp90's can be used to generate an effective vaccine containing a gp96-peptide complex.

Although the hsps can be allogeneic to the patient, in a
30 preferred embodiment, the hsps are autologous to (derived from) the patient to whom they are administered. The hsps and/or antigenic molecules can be purified from natural sources, chemically synthesized, or recombinantly produced. The invention provides methods for determining doses for
35 human cancer immunotherapy by evaluating the optimal dose of hsp noncovalently bound to peptide complexes in experimental tumor models and extrapolating the data. Specifically, a

scaling factor not exceeding a fifty fold increase over the effective dose estimated in animals, is used as the optimal prescription method for cancer immunotherapy or vaccination in human subjects.

5 The invention provides combinations of compositions which enhance the immunocompetence of the host individual and elicit specific immunity against infectious agents or specific immunity against preneoplastic and neoplastic cells. The therapeutic regimens and pharmaceutical compositions of
10 the invention are described below. These compositions have the capacity to prevent the onset and progression of infectious diseases and prevent the development of tumor cells and to inhibit the growth and progression of tumor cells indicating that such compositions can induce specific
15 immunity in infectious diseases and cancer immunotherapy.

Hsps appear to induce an inflammatory reaction at the tumor site and ultimately cause a regression of the tumor burden in the cancer patients treated. Cancers which can be treated with complexes of hsps noncovalently bound to
20 antigenic molecules include, but are not limited to, human sarcomas and carcinomas.

Accordingly, the invention provides methods of preventing and treating cancer in an individual comprising administering a composition which stimulates the
25 immunocompetence of the host individual and elicits specific immunity against the preneoplastic and/or neoplastic cells. As used herein, "preneoplastic" cell refers to a cell which is in transition from a normal to a neoplastic form; and morphological evidence, increasingly supported by molecular
30 biologic studies, indicates that preneoplasia progresses through multiple steps. Non-neoplastic cell growth commonly consists of hyperplasia, metaplasia, or most particularly, dysplasia (for review of such abnormal growth conditions (See Robbins and Angell, 1976, *Basic Pathology*, 2d Ed., W.B.
35 Saunders Co., Philadelphia, pp. 68-79). Hyperplasia is a form of controlled cell proliferation involving an increase in cell number in a tissue or organ, without significant

alteration in structure or function. As but one example, endometrial hyperplasia often precedes endometrial cancer. Metaplasia is a form of controlled cell growth in which one type of adult or fully differentiated cell substitutes for
5 another type of adult cell. Metaplasia can occur in epithelial or connective tissue cells. Atypical metaplasia involves a somewhat disorderly metaplastic epithelium. Dysplasia is frequently a forerunner of cancer, and is found mainly in the epithelia; it is the most disorderly form of
10 non-neoplastic cell growth, involving a loss in individual cell uniformity and in the architectural orientation of cells. Dysplastic cells often have abnormally large, deeply stained nuclei, and exhibit pleomorphism. Dysplasia characteristically occurs where there exists chronic
15 irritation or inflammation, and is often found in the cervix, respiratory passages, oral cavity, and gall bladder. Although preneoplastic lesions may progress to neoplasia, they may also remain stable for long periods and may even regress, particularly if the inciting agent is removed or if
20 the lesion succumbs to an immunological attack by its host.

The therapeutic regimens and pharmaceutical compositions of the invention may be used with additional immune response enhancers or biological response modifiers including, but not limited to, the cytokines IFN- α , IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6,
25 TNF, or other cytokine affecting immune cells. In accordance with this aspect of the invention, the complexes of the hsp and antigenic molecule are administered in combination therapy with one or more of these cytokines.

The invention further relates to administration of
30 complexes of hsp-antigenic molecules to individuals at enhanced risk of cancer due to familial history or environmental risk factors.

5.1. Dosage Regimens

35 It was established in experimental tumor models (Blachere et al., 1993, *J. Immunotherapy* 14:352-356) that the lowest dose of hsp noncovalently bound to peptide complexes

which produced tumor regression in mice was between 10 and 25 microgram/mouse weighing 20-25g which is equal to $25\text{mg}/25\text{g} = 1\text{mg/kg}$. Prior art methods extrapolate to human dosages based on body weight and surface area. For example, prior art methods of extrapolating human dosage based on body weight can be carried out as follows: since the conversion factor for converting the mouse dosage to human dosage is Dose Human per kg = Dose Mouse per kg x 12 (See Freireich, E.J., et al., 1966, *Cancer Chemotherap. Rep.* 50:219-244), the effective dose of hsp-peptide complexes in humans weighing 70kg should be $1\text{mg/kg} \div 12 \times 70$, i.e., about 6mg (5.8mg).

Drug doses are also given in milligrams per square meter of body surface area because this method rather than body weight achieves a good correlation to certain metabolic and excretory functions (Shirkey, H.C., 1965, *JAMA* 193:443). Moreover, body surface area can be used as a common denominator for drug dosage in adults and children as well as in different animal species as indicated below in Table 1 (Freireich, E.J., et al., 1966, *Cancer Chemotherap. Rep.* 50:219-244).

TABLE 1

**REPRESENTATIVE SURFACE AREA TO WEIGHT
RATIOS (km) FOR VARIOUS SPECIES¹**

	Species	Body Weight (kg)	Surface Area (Sqm)	km Factor
25	Mouse	0.02	0.0066	3.0
	Rat	0.15	0.025	5.9
	Monkey	3.0	0.24	12
	Dog	8.0	0.40	20
30	Human, Child	20	0.80	25
	Adult	60	1.6	37

Example: To express a mg/kg dose in any given species as the equivalent mg/sq m dose, multiply the

¹ Freireich, et al., 1966, *Cancer Chemotherap. Rep.* 50: 219-244.

dose by the appropriate km factor. In adult human, 100mg/kg is equivalent to $100 \text{ mg/kg} \times 37 \text{ kg/sq m} = 3700 \text{ mg/sq m}$.

In contrast to both of the above-described prior art methods of determining dosage levels, the present invention provides dosages of the purified complexes of hsps and antigenic molecules that are much smaller than the dosages estimated by the prior art. For example, according to the invention, an amount of hsp70- and/or gp96-antigenic molecule complexes is administered that is in the range of about 10 microgram to about 600 micrograms for a human patient, the preferred human dosage being the same as used in a 25g mouse, i.e., in the range of 10-100 micrograms. The dosage for hsp-90 peptide complexes in a human patient provided by the present invention is in the range of about 50 to 5,000 micrograms, the preferred dosage being 100 micrograms.

The doses recited above are preferably given once weekly for a period of about 4-6 weeks, and the mode or site of administration is preferably varied with each administration. In a preferred example, subcutaneous administrations are given, with each site of administration varied sequentially. Thus, by way of example and not limitation, the first injection may be given subcutaneously on the left arm, the second on the right arm, the third on the left belly, the fourth on the right belly, the fifth on the left thigh, the sixth on the right thigh, etc. The same site may be repeated after a gap of one or more injections. Also, split injections may be given. Thus, for example, half the dose may be given in one site and the other half on an other site on the same day.

Alternatively, the mode of administration is sequentially varied, e.g., weekly injections are given in sequence subcutaneously, intramuscularly, intravenously or intraperitoneally.

After 4-6 weeks, further injections are preferably given at two-week intervals over a period of time of one month. Later injections may be given monthly. The pace of later

injections may be modified, depending upon the patient's clinical progress and responsiveness to the immunotherapy.

The invention is illustrated by non-limiting examples in Sections 6 and 7.

5

5.2. Therapeutic Compositions for Immune Responses to Cancer

The compositions comprising hsp noncovalently bound to antigenic molecules are administered to elicit an effective
10 specific immune response to the complexed antigenic molecules (and not to the hsp).

In a preferred embodiment, non-covalent complexes of hsp70, hsp90 and gp96 with peptides are prepared and purified
15 postoperatively from tumor cells obtained from the cancer patient.

In accordance with the methods described herein, immunogenic or antigenic peptides that are endogenously complexed to hsps or MHC antigens can be used as antigenic
20 molecules. For example, such peptides may be prepared that stimulate cytotoxic T cell responses against different tumor antigens (e.g., tyrosinase, gp100, melan-A, gp75, mucins, etc.) and viral proteins including, but not limited to, proteins of immunodeficiency virus type I (HIV-I), human immunodeficiency virus type II (HIV-II), hepatitis type A,
25 hepatitis type B, hepatitis type C, influenza, Varicella, adenovirus, herpes simplex type I (HSV-I), herpes simplex type II (HSV-II), rinderpest, rhinovirus, echovirus, rotavirus, respiratory syncytial virus, papilloma virus, papova virus, cytomegalovirus, echinovirus, arbovirus,
30 huntavirus, coxsackie virus, mumps virus, measles virus, rubella virus and polio virus. In the embodiment wherein the antigenic molecules are peptides noncovalently complexed to hsps *in vivo*, the complexes can be isolated from cells, or alternatively, produced *in vitro* from purified preparations
35 each of hsps and antigenic molecules.

In another specific embodiment, antigens of cancers (e.g., tumors) or infectious agents (e.g., viral antigen,

bacterial antigens, etc.) can be obtained by purification from natural sources, by chemical synthesis, or recombinantly, and, through in vitro procedures such as that described below, noncovalently complexed to hsps.

5 In an embodiment wherein the hsp-antigenic molecule complex to be used is a complex that is produced in vivo in cells, exemplary purification procedures such as described in Sections 5.2.1-5.2.3 below can be employed. Alternatively, in an embodiment wherein one wishes to use antigenic
10 molecules by complexing to hsps in vitro, hsps can be purified for such use from the endogenous hsp-peptide complexes in the presence of ATP or low pH (or chemically synthesized or recombinantly produced). The protocols described herein may be used to isolate hsp-peptide
15 complexes, or the hsps alone, from any eukaryotic cells for example, tissues, isolated cells, or immortalized eukaryote cell lines infected with a preselected intracellular pathogen, tumor cells or tumor cell lines.

20 5.2.1. Preparation and Purification of Hsp 70-peptide Complexes

The purification of hsp70-peptide complexes has been described previously, see, for example, Udono et al., 1993, *J. Exp. Med.* 178:1391-1396. A procedure that may be used,
25 presented by way of example but not limitation, is as follows:

Initially, tumor cells are suspended in 3 volumes of 1X Lysis buffer consisting of 5mM sodium phosphate buffer, pH 7, 150mM NaCl, 2mM CaCl₂, 2mM MgCl₂, and 1mM phenyl methyl
30 sulfonyl fluoride (PMSF). Then, the pellet is sonicated, on ice, until >99% cells are lysed as determined by microscopic examination. As an alternative to sonication, the cells may be lysed by mechanical shearing and in this approach the cells typically are resuspended in 30mM sodium bicarbonate
35 pH 7.5, 1mM PMSF, incubated on ice for 20 minutes and then homogenized in a dounce homogenizer until >95% cells are lysed.

Then the lysate is centrifuged at 1,000g for 10 minutes to remove unbroken cells, nuclei and other cellular debris. The resulting supernatant is recentrifuged at 100,000g for 90 minutes, the supernatant harvested and then mixed with Con A Sepharose equilibrated with phosphate buffered saline (PBS) containing 2mM Ca^{2+} and 2mM Mg^{2+} . When the cells are lysed by mechanical shearing the supernatant is diluted with an equal volume of 2X lysis buffer prior to mixing with Con A Sepharose. The supernatant is then allowed to bind to the Con A Sepharose for 2-3 hours at 4°C. The material that fails to bind is harvested and dialyzed for 36 hours (three times, 100 volumes each time) against 10mM Tris-Acetate pH 7.5, 0.1mM EDTA, 10mM NaCl, 1mM PMSF. Then the dialyzate is centrifuged at 17,000 rpm (Sorvall SS34 rotor) for 20 minutes. Then the resulting supernatant is harvested and applied to a Mono Q FPLC column equilibrated in 20mM Tris-Acetate pH 7.5, 20mM NaCl, 0.1mM EDTA and 15mM 2-mercaptoethanol. The column is then developed with a 20mM to 500mM NaCl gradient and then eluted fractions fractionated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and characterized by immunoblotting using an appropriate anti-hsp70 antibody (such as from clone N27F3-4, from StressGen).

Fractions strongly immunoreactive with the anti-hsp70 antibody are pooled and the hsp70-peptide complexes precipitated with ammonium sulfate; specifically with a 50%-70% ammonium sulfate cut. The resulting precipitate is then harvested by centrifugation at 17,000 rpm (SS34 Sorvall rotor) and washed with 70% ammonium sulfate. The washed precipitate is then solubilized and any residual ammonium sulfate removed by gel filtration on a Sephadex^R G25 column (Pharmacia). If necessary the hsp70 preparation thus obtained can be repurified through the Mono Q FPCL Column as described above.

The hsp70-peptide complex can be purified to apparent homogeneity using this method. Typically 1mg of hsp70-peptide complex can be purified from 1g of cells/tissue.

The present invention further describes a new and rapid method for purification of hsp70-peptide complexes. This improved method comprises contacting cellular proteins with ADP or a nonhydrolyzable analog of ATP affixed to a solid substrate, such that hsp70 in the lysate can bind to the ADP or nonhydrolyzable ATP analog, and eluting the bound hsp70. A preferred method uses column chromatography with ADP affixed to a solid substratum (e.g., ADP-agarose). The resulting hsp70 preparations are higher in purity and devoid of contaminating peptides. The hsp70 yields are also increased significantly by about more than 10 fold. Alternatively, chromatography with nonhydrolyzable analogs of ATP, instead of ADP, can be used for purification of hsp70-peptide complexes. By way of example but not limitation, purification of hsp70-peptide complexes by ADP-agarose chromatography was carried out as described in Example Section 9.

5.2.2. Preparation and Purification of Hsp 90-peptide Complexes

A procedure that can be used, presented by way of example and not limitation, is as follows:

Initially, tumor cells are suspended in 3 volumes of 1X Lysis buffer consisting of 5mM sodium phosphate buffer (pH7), 150mM NaCl, 2mM CaCl₂, 2mM MgCl₂, and 1mM phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF). Then, the pellet is sonicated, on ice, until >99% cells are lysed as determined by microscopic examination. As an alternative to sonication, the cells may be lysed by mechanical shearing and in this approach the cells typically are resuspended in 30mM sodium bicarbonate pH 7.5, 1mM PMSF, incubated on ice for 20 minutes and then homogenized in a dounce homogenizer until >95% cells are lysed.

Then the lysate is centrifuged at 1,000g for 10 minutes to remove unbroken cells, nuclei and other cellular debris. The resulting supernatant is recentrifuged at 100,000g for 90 minutes, the supernatant harvested and then mixed with Con A

Sepharose equilibrated with PBS containing 2mM Ca^{2+} and 2mM Mg^{2+} . When the cells are lysed by mechanical shearing the supernatant is diluted with an equal volume of 2X Lysis buffer prior to mixing with Con A Sepharose. The supernatant
5 is then allowed to bind to the Con A Sepharose for 2-3 hours at 4°C. The material that fails to bind is harvested and dialyzed for 36 hours (three times, 100 volumes each time) against 10mM Tris-Acetate pH 7.5, 0.1mM EDTA, 10mM NaCl, 1mM PMSF. Then the dialyzate is centrifuged at 17,000 rpm
10 (Sorvall SS34 rotor) for 20 minutes. Then the resulting supernatant is harvested and applied to a Mono Q FPLC column equilibrated with lysis buffer. The proteins are then eluted with a salt gradient of 200mM to 600mM NaCl.

The eluted fractions are fractionated by SDS-PAGE and
15 fractions containing the hsp90-peptide complexes identified by immunoblotting using an anti-hsp90 antibody such as 3G3 (Affinity Bioreagents). Hsp90-peptide complexes can be purified to apparent homogeneity using this procedure. Typically, 150-200 µg of hsp90-peptide complex can be
20 purified from 1g of cells/tissue.

5.2.3. Preparation and Purification of gp96-peptide Complexes

A procedure that can be used, presented by way of
25 example and not limitation, is as follows:

A pellet of tumors is resuspended in 3 volumes of buffer consisting of 30mM sodium bicarbonate buffer (pH 7.5) and 1mM PMSF and the cells allowed to swell on ice 20 minutes. The cell pellet then is homogenized in a Dounce homogenizer (the
30 appropriate clearance of the homogenizer will vary according to each cells type) on ice until >95% cells are lysed.

The lysate is centrifuged at 1,000g for 10 minutes to remove unbroken cells, nuclei and other debris. The supernatant from this centrifugation step then is
35 recentrifuged at 100,000g for 90 minutes. The gp96-peptide complex can be purified either from the 100,000 pellet or from the supernatant.

When purified from the supernatant, the supernatant is diluted with equal volume of 2X lysis buffer and the supernatant mixed for 2-3 hours at 4°C with Con a sepharose equilibrated with PBS containing 2mM Ca^{2+} and 2mM Mg^{2+} . Then, the slurry is packed into a column and washed with 1X lysis buffer until the OD_{280} drops to baseline. Then, the column is washed with 1/3 column bed volume of 10% α -methyl mannoside (α -MM) dissolved in PBS containing 2mM Ca^{2+} and 2mM Mg^{2+} , the column sealed with a piece of parafilm, and incubated at 37°C for 15 minutes. Then the column is cooled to room temperature and the parafilm removed from the bottom of the column. Five column volumes of the α -MM buffer are applied to the column and the eluate analyzed by SDS-PAGE. Typically the resulting material is about 60-95% pure, however this depends upon the cell type and the tissue-to-lysis buffer ratio used. Then the sample is applied to a Mono Q FPLC column (Pharmacia) equilibrated with a buffer containing 5mM sodium phosphate, pH 7. The proteins then are eluted from the column with a 0-1M NaCl gradient and the gp96 fraction elutes between 400mM and 550mM NaCl.

The procedure, however, may be modified by two additional steps, used either alone or in combination, to consistently produce apparently homogeneous gp96-peptide complexes. One optional step involves an ammonium sulfate precipitation prior to the Con A purification step and the other optional step involves DEAE-Sepharose purification after the Con A purification step but before the Mono Q FPLC step.

In the first optional step, the supernatant resulting from the 100,000g centrifugation step is brought to a final concentration of 50% ammonium sulfate by the addition of ammonium sulfate. The ammonium sulfate is added slowly while gently stirring the solution in a beaker placed in a tray of ice water. The solution is stirred from about 1/2 to 12 hours at 4°C and the resulting solution centrifuged at 6,000 rpm (Sorvall SS34 rotor). The supernatant resulting from this step is removed, brought to 70% ammonium sulfate

saturation by the addition of ammonium sulfate solution, and centrifuged at 6,000 rpm (Sorvall SS34 rotor). The resulting pellet from this step is harvested and suspended in PBS containing 70% ammonium sulfate in order to rinse the pellet.

5 This mixture is centrifuged at 6,000 rpm (Sorvall SS34 rotor) and the pellet dissolved in PBS containing 2mM Ca^{2+} and Mg^{2+} . Undissolved material is removed by a brief centrifugation at 15,000 rpm (Sorvall SS34 rotor). Then, the solution is mixed with Con A Sepharose and the procedure followed as before.

10 In the second optional step, the gp96 containing fractions eluted from the Con A column are pooled and the buffer exchanged for 5mM sodium phosphate buffer, pH 7, 300mM NaCl by dialysis, or preferably by buffer exchange on a Sephadex G25 column. After buffer exchange, the solution is
15 mixed with DEAE-Sepharose previously equilibrated with 5mM sodium phosphate buffer, pH 7, 300mM NaCl. The protein solution and the beads are mixed gently for 1 hour and poured into a column. Then, the column is washed with 5mM sodium phosphate buffer, pH 7, 300mM NaCl, until the absorbance at
20 280nm drops to baseline. Then, the bound protein is eluted from the column with five volumes of 5mM sodium phosphate buffer, pH 7, 700mM NaCl. Protein containing fractions are pooled and diluted with 5mM sodium phosphate buffer, pH 7 in order to lower the salt concentration to 175mM. The
25 resulting material then is applied to the Mono Q FPLC column (Pharmacia) equilibrated with 5mM sodium phosphate buffer, pH 7 and the protein that binds to the Mono Q FPLC column (Pharmacia) is eluted as described before.

It is appreciated, however, that one skilled in the art
30 may assess, by routine experimentation, the benefit of incorporating the second optional step into the purification protocol. In addition, it is appreciated also that the benefit of adding each of the optional steps will depend upon the source of the starting material.

35 When the gp96 fraction is isolated from the 100,000g pellet, the pellet is suspended in 5 volumes of PBS containing either 1% sodium deoxycholate or 1% octyl

glucopyranoside (but without the Mg^{2+} and Ca^{2+}) and incubated on ice for 1 hour. The suspension is centrifuged at 20,000g for 30 minutes and the resulting supernatant dialyzed against several changes of PBS (also without the Mg^{2+} and Ca^{2+}) to
5 remove the detergent. The dialysate is centrifuged at 100,000g for 90 minutes, the supernatant harvested, and calcium and magnesium are added to the supernatant to give final concentrations of 2mM, respectively. Then the sample is purified by either the unmodified or the modified method
10 for isolating gp96-peptide complex from the 100,000g supernatant, see above.

The gp96-peptide complexes can be purified to apparent homogeneity using this procedure. About 10-20 μ g of gp96 can be isolated from 1g cells/tissue.

15

Infectious Disease

In an alternative embodiment wherein it is desired to treat a patient having an infectious disease the above-described methods in Sections 5.2.1 - 5.2.3 are used to
20 isolate hsp-peptide complexes from cells infected with an infectious organism, e.g., of a cell line or from a patient. Such infectious organisms include but are not limited to, viruses, bacterial, protozoa, fungi, and parasites as described in detail in Section 5.2.4 below.

25

5.2.4. Isolation of Antigenic/Immunogenic Components

It has been found that antigenic peptides and/or components can be eluted from hsp-complexes either in the presence of ATP or low pH. These experimental conditions may
30 be used to isolate peptides and/or antigenic components from cells which may contain potentially useful antigenic determinants. Once isolated, the amino acid sequence of each antigenic peptide may be determined using conventional amino acid sequencing methodologies. Such antigenic molecules can
35 then be produced by chemical synthesis or recombinant methods, purified, and complexed to hsps in vitro.

Similarly, it has been found that potentially immunogenic peptides may be eluted from MHC-peptide complexes using techniques well known in the art (Falk, K. et al., 1990 *Nature* 348:248-251; Elliott, T., et al., 1990, *Nature* 348:195-197; Falk, K., et al., 1991, *Nature* 351:290-296).

Thus, potentially immunogenic or antigenic peptides may be isolated from either endogenous stress protein-peptide complexes or endogenous MHC-peptide complexes for use subsequently as antigenic molecules, by complexing *in vitro* to hsp's. Exemplary protocols for isolating peptides and/or antigenic components from either of these complexes are set forth below in Sections 5.2.4.1 and 5.2.4.2.

5.2.4.1 Peptides From Stress Protein-Peptide Complexes

Two methods may be used to elute the peptide from a stress protein-peptide complex. One approach involves incubating the stress protein-peptide complex in the presence of ATP. The other approach involves incubating the complexes in a low pH buffer.

Briefly the complex of interest is centrifuged through a Centricon 10 assembly (Millipore) to remove any low molecular weight material loosely associated with the complex. The large molecular weight fraction may be removed and analyzed by SDS-PAGE while the low molecular weight may be analyzed by HPLC as described below. In the ATP incubation protocol, the stress protein-peptide complex in the large molecular weight fraction is incubated with 10mM ATP for 30 minutes at room temperature. In the low pH protocol, acetic acid or trifluoro acetic acid is added to the stress protein-peptide complex to give a final concentration of 10% (vol/vol) and the mixture incubated at room temperature or in a boiling water bath or any temperature in between, for 10 minutes (See, Van Bleek, et al., 1990, *Nature* 348:213-216; and Li, et al., 1993, *EMBO Journal* 12:3143-3151).

The resulting samples are centrifuged through an Centricon 10 assembly as mentioned previously. The high and low molecular weight fractions are recovered. The remaining

large molecular weight stress protein-peptide complexes can be reincubated with ATP or low pH to remove any remaining peptides.

The resulting lower molecular weight fractions are
5 pooled, concentrated by evaporation and dissolved in 0.1% trifluoroacetic acid (TFA). The dissolved material is then fractionated by reverse phase high pressure liquid chromatography (HPLC) using for example a VYDAC CIB reverse phase column equilibrated with 0.1% TFA. The bound material
10 is then eluted at a flow rate of about 0.8 ml/min by developing the column with a linear gradient of 0 to 80% acetonitrile in 0.1% TFA. The elution of the peptides can be monitored by OD₂₁₀ and the fractions containing the peptides collected.

15

5.2.4.2 Peptides from MHC-peptide Complexes.

The isolation of potentially immunogenic peptides from MHC molecules is well known in the art and so is not described in detail herein (See, Falk, et al., 1990, *Nature*
20 348:248-251; Rotzsche, et al., 1990, *Nature* 348:252-254; Elliott, et al., 1990, *Nature* 348:191-197; Falk, et al., 1991, *Nature* 351:290-296; Demotz, et al., 1989, *Nature* 343:682-684; Rotzsche, et al., 1990, *Science* 249:283-287), the disclosures of which are incorporated herein by
25 reference.

Briefly, MHC-peptide complexes may be isolated by a conventional immunoaffinity procedure. The peptides then may be eluted from the MHC-peptide complex by incubating the complexes in the presence of about 0.1% TFA in acetonitrile.
30 The eluted peptides may be fractionated and purified by reverse phase HPLC, as before.

The amino acid sequences of the eluted peptides may be determined either by manual or automated amino acid sequencing techniques well known in the art. Once the amino
35 acid sequence of a potentially protective peptide has been determined the peptide may be synthesized in any desired

amount using conventional peptide synthesis or other protocols well known in the art.

Peptides having the same amino acid sequence as those isolated above may be synthesized by solid-phase peptide synthesis using procedures similar to those described by Merrifield, 1963, *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149. During synthesis, N- α -protected amino acids having protected side chains are added stepwise to a growing polypeptide chain linked by its C-terminal and to an insoluble polymeric support i.e., polystyrene beads. The peptides are synthesized by linking an amino group of an N- α -deprotected amino acid to an α -carboxy group of an N- α -protected amino acid that has been activated by reacting it with a reagent such as dicyclohexylcarbodiimide. The attachment of a free amino group to the activated carboxyl leads to peptide bond formation. The most commonly used N- α -protecting groups include Boc which is acid labile and Fmoc which is base labile.

Briefly, the C-terminal N- α -protected amino acid is first attached to the polystyrene beads. The N- α -protecting group is then removed. The deprotected α -amino group is coupled to the activated α -carboxylate group of the next N- α -protected amino acid. The process is repeated until the desired peptide is synthesized. The resulting peptides are then cleaved from the insoluble polymer support and the amino acid side chains deprotected. Longer peptides can be derived by condensation of protected peptide fragments. Details of appropriate chemistries, resins, protecting groups, protected amino acids and reagents are well known in the art and so are not discussed in detail herein (See, Atherton, et al., 1989, *Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press, and Bodanszky, 1993, *Peptide Chemistry, A Practical Textbook*, 2nd Ed., Springer-Verlag).

Purification of the resulting peptides is accomplished using conventional procedures, such as preparative HPLC using gel permeation, partition and/or ion exchange chromatography.

The choice of appropriate matrices and buffers are well known in the art and so are not described in detail herein.

5.2.5 Exogenous Antigenic Molecules

5 Antigens or antigenic portions thereof can be selected for use as antigenic molecules, for complexing to hsps, from among those known in the art or determined by immunoassay to be able to bind to antibody or MHC molecules (antigenicity) or generate immune response (immunogenicity). To determine
10 immunogenicity or antigenicity by detecting binding to antibody, various immunoassays known in the art can be used, including but not limited to competitive and non-competitive assay systems using techniques such as radioimmunoassays, ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), "sandwich"
15 immunoassays, immunoradiometric assays, gel diffusion precipitin reactions, immunodiffusion assays, *in vivo* immunoassays (using colloidal gold, enzyme or radioisotope labels, for example), western blots, immunoprecipitation reactions, agglutination assays (e.g., gel agglutination
20 assays, hemagglutination assays), complement fixation assays, immunofluorescence assays, protein A assays, and immunoelectrophoresis assays, etc. In one embodiment, antibody binding is detected by detecting a label on the primary antibody. In another embodiment, the primary
25 antibody is detected by detecting binding of a secondary antibody or reagent to the primary antibody. In a further embodiment, the secondary antibody is labelled. Many means are known in the art for detecting binding in an immunoassay and are envisioned for use. In one embodiment for detecting
30 immunogenicity, T cell-mediated responses can be assayed by standard methods, e.g., *in vitro* cytotoxicity assays or *in vivo* delayed-type hypersensitivity assays.

Potentially useful antigens or derivatives thereof for use as antigenic molecules can also be identified by various
35 criteria, such as the antigen's involvement in neutralization of a pathogen's infectivity (wherein it is desired to treat or prevent infection by such a pathogen) (Norrby, 1985,

Summary, in *Vaccines 85*, Lerner, et al. (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, pp. 388-389), type or group specificity, recognition by patients' antisera or immune cells, and/or the demonstration of
5 protective effects of antisera or immune cells specific for the antigen. In addition, where it is desired to treat or prevent a disease caused by pathogen, the antigen's encoded epitope should preferably display a small or no degree of antigenic variation in time or amongst different isolates of
10 the same pathogen.

Preferably, where it is desired to treat or prevent cancer, known tumor-specific antigens or fragments or derivatives thereof are used. For example, such tumor specific or tumor-associated antigens include but are not
15 limited to KS 1/4 pan-carcinoma antigen (Perez and Walker, 1990, *J. Immunol.* 142:3662-3667; Bumal, 1988, *Hybridoma* 7(4):407-415); ovarian carcinoma antigen (CA125) (Yu, et al., 1991, *Cancer Res.* 51(2):468-475); prostatic acid phosphate (Tailer, et al., 1990, *Nucl. Acids Res.* 18(16):4928);
20 prostate specific antigen (Henttu and Vihko, 1989, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 160(2):903-910; Israeli, et al., 1993, *Cancer Res.* 53:227-230); melanoma-associated antigen p97 (Estin, et al., 1989, *J. Natl. Cancer Inst.* 81(6):445-446); melanoma antigen gp75 (Vijayasardahl, et al., 1990, *J. Exp.*
25 *Med.* 171(4):1375-1380); high molecular weight melanoma antigen (Natali, et al., 1987, *Cancer* 59:55-63) and prostate specific membrane antigen.

In a specific embodiment, an antigen or fragment or derivative thereof specific to a certain tumor is selected
30 for complexing to hsp and subsequent administration to a patient having that tumor.

Preferably, where it is desired to treat or prevent viral diseases, molecules comprising epitopes of known viruses are used. For example, such antigenic epitopes may
35 be prepared from viruses including, but not limited to, hepatitis type A hepatitis type B, hepatitis type C, influenza, varicella, adenovirus, herpes simplex type I (HSV-

I), herpes simplex type II (HSV-II), rinderpest, rhinovirus, echovirus, rotavirus, respiratory syncytial virus, papilloma virus, papova virus, cytomegalovirus, echinovirus, arbovirus, huntavirus, coxsachie virus, mumps virus, measles virus, rubella virus, polio virus, human immunodeficiency virus type I (HIV-I), and human immunodeficiency virus type II (HIV-II).

Preferably, where it is desired to treat or prevent bacterial infections, molecules comprising epitopes of known bacteria are used. For example, such antigenic epitopes may be prepared from bacteria including, but not limited to, mycobacteria rickettsia, mycoplasma, neisseria and legionella.

Preferably, where it is desired to treat or prevent protozoal infectious, molecules comprising epitopes of known protozoa are used. For example, such antigenic epitopes may be prepared from protozoa including, but not limited to, leishmania, kokzidioa, and trypanosoma.

Preferably, where it is desired to treat or prevent parasitic infectious, molecules comprising epitopes of known parasites are used. For example, such antigenic epitopes may be from parasites including, but not limited to, chlamydia and rickettsia.

5.2.6 In Vitro Production of Stress Protein-Antigenic Molecule Complexes

In an embodiment in which complexes of hsps and the peptides with which they are endogenously associated *in vivo* are not employed, complexes of hsps to antigenic molecules are produced *in vitro*. As will be appreciated by those skilled in the art, the peptides either isolated by the aforementioned procedures or chemically synthesized or recombinantly produced may be reconstituted with a variety of naturally purified or recombinant stress proteins *in vitro* to generate immunogenic non-covalent stress protein-antigenic molecule complexes. Alternatively, exogenous antigens or antigenic/immunogenic fragments or derivatives thereof can be noncovalently complexed to stress proteins for use in the

immunotherapeutic or prophylactic vaccines of the invention. A preferred, exemplary protocol for noncovalently complexing a stress protein and an antigenic molecule *in vitro* is discussed below.

5 Prior to complexing, the hsps are pretreated with ATP or low pH to remove any peptides that may be associated with the hsp of interest. When the ATP procedure is used, excess ATP is removed from the preparation by the addition of apyranase as described by Levy, et al., 1991, *Cell* 67:265-274. When
10 the low pH procedure is used, the buffer is readjusted to neutral pH by the addition of pH modifying reagents.

The antigenic molecules (1 μ g) and the pretreated hsp (9 μ g) are admixed to give an approximately 5 antigenic molecule: 1 stress protein molar ratio. Then, the mixture is
15 incubated for 15 minutes to 3 hours at 4° to 45°C in a suitable binding buffer such as one containing 20mM sodium phosphate, pH 7.2, 350mM NaCl, 3mM MgCl₂, and 1mM phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF). The preparations are centrifuged through Centricon 10 assembly (Millipore) to remove any
20 unbound peptide. The association of the peptides with the stress proteins can be assayed by SDS-PAGE. This is the preferred method for *in vitro* complexing of peptides isolated from MHC-peptide complexes of peptides disassociated from endogenous hsp-peptide complexes.

25 In an alternative embodiment of the invention, preferred for producing complexes of hsp70 to exogenous antigenic molecules such as proteins, 5-10 micrograms of purified hsp is incubated with equimolar quantities of the antigenic molecule in 20mM sodium phosphate buffer pH 7.5, 0.5M NaCl,
30 3mM MgCl₂, and 1mM ADP in a volume of 100 microliter at 37°C for 1 hr. This incubation mixture is further diluted to 1ml in phosphate-buffered saline.

In an alternative embodiment of the invention, preferred for producing complexes of gp96 or hsp90 to peptides, 5 -10
35 micrograms of purified gp96 or hsp90 is incubated with equimolar or excess quantities of the antigenic peptide in a suitable buffer such as one containing 20mM sodium phosphate

buffer pH 7.5, 0.5M NaCl, 3mM MgCl₂ at 60-65°C for 5-20 min. This incubation mixture is allowed to cool to room temperature and centrifuged one or more times if necessary, through Centricon 10 assembly (Millipore) to remove any
5 unbound peptide.

Following complexing, the immunogenic stress protein-antigenic molecule complexes can optionally be assayed in vitro using for example the mixed lymphocyte target cell assay (MLTC) described below. Once immunogenic complexes
10 have been isolated they can be optionally characterized further in animal models using the preferred administration protocols and excipients discussed below.

15 5.2.7 Determination of Immunogenicity of Stress Protein-Peptide Complexes

The purified stress protein-antigenic molecule complexes can be assayed for immunogenicity using the mixed lymphocyte target culture assay (MLTC) well known in the art.

By way of example but not limitation, the following
20 procedure can be used. Briefly, mice are injected subcutaneously with the candidate stress protein-antigenic molecule complexes. Other mice are injected with either other stress protein peptide complexes or whole infected cells which act as positive controls for the assay. The mice
25 are injected twice, 7-10 days apart. Ten days after the last immunization, the spleens are removed and the lymphocytes released. The released lymphocytes may be restimulated subsequently in vitro by the addition of dead cells that expressed the complex of interest.

30 For example, 8×10^6 immune spleen cells may be stimulated with 4×10^4 mitomycin C treated or γ -irradiated (5-10,000 rads) infected cells (or cells transfected with an appropriate gene, as the case may be) in 3ml RPMI medium containing 10% fetal calf serum. In certain cases 33% secondary mixed
35 lymphocyte culture supernatant may be included in the culture medium as a source of T cell growth factors (See, Glasebrook, et al., 1980, *J. Exp. Med.* 151:876). To test the primary

cytotoxic T cell response after immunization, spleen cells may be cultured without stimulation. In some experiments spleen cells of the immunized mice may also be restimulated with antigenically distinct cells, to determine the
5 specificity of the cytotoxic T cell response.

Six days later the cultures are tested for cytotoxicity in a 4 hour ^{51}Cr -release assay (See, Palladino, et al., 1987, *Cancer Res.* 47:5074-5079 and Blachere, et al., 1993, *J. Immunotherapy* 14:352-356). In this assay, the mixed
10 lymphocyte culture is added to a target cell suspension to give different effector:target (E:T) ratios (usually 1:1 to 40:1). The target cells are prelabelled by incubating 1×10^6 target cells in culture medium containing 200 mCi $^{51}\text{Cr}/\text{ml}$ for one hour at 37°C . The cells are washed three times following
15 labeling. Each assay point (E:T ratio) is performed in triplicate and the appropriate controls incorporated to measure spontaneous ^{51}Cr release (no lymphocytes added to assay) and 100% release (cells lysed with detergent). After incubating the cell mixtures for 4 hours, the cells are
20 pelleted by centrifugation at 200g for 5 minutes. The amount of ^{51}Cr released into the supernatant is measured by a gamma counter. The percent cytotoxicity is measured as cpm in the test sample minus spontaneously released cpm divided by the total detergent released cpm minus spontaneously released
25 cpm.

In order to block the MHC class I cascade a concentrated hybridoma supernatant derived from K-44 hybridoma cells (an anti-MHC class I hybridoma) is added to the test samples to a final concentration of 12.5%.

30

5.3. Formulation

Hsp-antigenic molecule complexes of the invention may be formulated into pharmaceutical preparations for
administration to mammals for treatment or prevention of
35 cancer or infectious diseases. Compositions comprising a compound of the invention formulated in a compatible pharmaceutical carrier may be prepared, packaged, and

labelled for treatment of the indicated tumor, such as human sarcomas and carcinomas, e.g., fibrosarcoma, myxosarcoma, liposarcoma, chondrosarcoma, osteogenic sarcoma, chordoma, angiosarcoma, endotheliosarcoma, lymphangiosarcoma, lymphangioendotheliosarcoma, synovioma, mesothelioma, Ewing's tumor, leiomyosarcoma, rhabdomyosarcoma, colon carcinoma, pancreatic cancer, breast cancer, ovarian cancer, prostate cancer, squamous cell carcinoma, basal cell carcinoma, adenocarcinoma, sweat gland carcinoma, sebaceous gland carcinoma, papillary carcinoma, papillary adenocarcinomas, cystadenocarcinoma, medullary carcinoma, bronchogenic carcinoma, renal cell carcinoma, hepatoma, bile duct carcinoma, choriocarcinoma, seminoma, embryonal carcinoma, Wilms' tumor, cervical cancer, testicular tumor, lung carcinoma, small cell lung carcinoma, bladder carcinoma, epithelial carcinoma, glioma, astrocytoma, medulloblastoma, craniopharyngioma, ependymoma, pinealoma, hemangioblastoma, acoustic neuroma, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma; leukemias, e.g., acute lymphocytic leukemia and acute myelocytic leukemia (myeloblastic, promyelocytic, myelomonocytic, monocytic and erythroleukemia); chronic leukemia (chronic myelocytic (granulocytic) leukemia and chronic lymphocytic leukemia); and polycythemia vera, lymphoma (Hodgkin's disease and non-Hodgkin's disease), multiple myeloma, Waldenström's macroglobulinemia, and heavy chain disease. Alternatively, it can be labeled for treatment of the appropriate infectious disease. Alternatively, pharmaceutical compositions may be formulated for treatment of appropriate infectious diseases.

If the complex is water-soluble, then it may be formulated in an appropriate buffer, for example, phosphate buffered saline or other physiologically compatible solutions. Alternatively, if the resulting complex has poor solubility in aqueous solvents, then it may be formulated with a non-ionic surfactant such as Tween, or polyethylene glycol. Thus, the compounds and their physiologically acceptable solvates may be formulated for administration by

inhalation or insufflation (either through the mouth or the nose) or oral, buccal, parenteral, rectal administration or, in the case of tumors, directly injected into a solid tumor.

For oral administration, the pharmaceutical preparation
5 may be in liquid form, for example, solutions, syrups or suspensions, or may be presented as a drug product for reconstitution with water or other suitable vehicle before use. Such liquid preparations may be prepared by conventional means with pharmaceutically acceptable additives
10 such as suspending agents (e.g., sorbitol syrup, cellulose derivatives or hydrogenated edible fats); emulsifying agents (e.g., lecithin or acacia); non-aqueous vehicles (e.g., almond oil, oily esters, or fractionated vegetable oils); and preservatives (e.g., methyl or propyl-p-hydroxybenzoates or
15 sorbic acid). The pharmaceutical compositions may take the form of, for example, tablets or capsules prepared by conventional means with pharmaceutically acceptable excipients such as binding agents (e.g., pregelatinized maize starch, polyvinyl pyrrolidone or hydroxypropyl
20 methylcellulose); fillers (e.g., lactose, microcrystalline cellulose or calcium hydrogen phosphate); lubricants (e.g., magnesium stearate, talc or silica); disintegrants (e.g., potato starch or sodium starch glycolate); or wetting agents (e.g., sodium lauryl sulphate). The tablets may be coated by
25 methods well-known in the art.

Preparations for oral administration may be suitably formulated to give controlled release of the active compound.

For buccal administration, the compositions may take the form of tablets or lozenges formulated in conventional
30 manner.

For administration by inhalation, the compounds for use according to the present invention are conveniently delivered in the form of an aerosol spray presentation from pressurized packs or a nebulizer, with the use of a suitable propellant,
35 e.g., dichlorodifluoromethane, trichlorofluoromethane, dichlorotetrafluoroethane, carbon dioxide or other suitable gas. In the case of a pressurized aerosol the dosage unit

may be determined by providing a valve to deliver a metered amount. Capsules and cartridges of, e.g., gelatin for use in an inhaler or insufflator may be formulated containing a powder mix of the compound and a suitable powder base such as 5 lactose or starch.

The compounds may be formulated for parenteral administration by injection, e.g., by bolus injection or continuous infusion. Formulations for injection may be presented in unit dosage form, e.g., in ampoules or in multi-10 dose containers, with an added preservative. The compositions may take such forms as suspensions, solutions or emulsions in oily or aqueous vehicles, and may contain formulatory agents such as suspending, stabilizing and/or dispersing agents. Alternatively, the active ingredient may 15 be in powder form for constitution with a suitable vehicle, e.g., sterile pyrogen-free water, before use.

The compounds may also be formulated in rectal compositions such as suppositories or retention enemas, e.g., containing conventional suppository bases such as cocoa 20 butter or other glycerides.

In addition to the formulations described previously, the compounds may also be formulated as a depot preparation. Such long acting formulations may be administered by implantation (for example, subcutaneously or intramuscularly) 25 or by intramuscular injection. Thus, for example, the compounds may be formulated with suitable polymeric or hydrophobic materials (for example, as an emulsion in an acceptable oil) or ion exchange resins, or as sparingly soluble derivatives, for example, as a sparingly soluble 30 salt. Liposomes and emulsions are well known examples of delivery vehicles or carriers for hydrophilic drugs.

The compositions may, if desired, be presented in a pack or dispenser device which may contain one or more unit dosage forms containing the active ingredient. The pack may for 35 example comprise metal or plastic foil, such as a blister pack. The pack or dispenser device may be accompanied by instructions for administration.

The invention also provides kits for carrying out the therapeutic regimens of the invention. Such kits comprise in one or more containers therapeutically or prophylactically effective amounts of the hsp-antigenic molecule complexes in 5 pharmaceutically acceptable form. The hsp-antigenic molecule complex in a vial of a kit of the invention may be in the form of a pharmaceutically acceptable solution, e.g., in combination with sterile saline, dextrose solution, or buffered solution, or other pharmaceutically acceptable 10 sterile fluid. Alternatively, the complex may be lyophilized or desiccated; in this instance, the kit optionally further comprises in a container a pharmaceutically acceptable solution (e.g., saline, dextrose solution, etc.), preferably sterile, to reconstitute the complex to form a solution for 15 injection purposes.

In another embodiment, a kit of the invention further comprises a needle or syringe, preferably packaged in sterile form, for injecting the complex, and/or a packaged alcohol pad. Instructions are optionally included for administration 20 of hsp-antigenic molecule complexes by a clinician or by the patient.

5.4 Target Infectious Diseases

Infectious diseases that can be treated or prevented by 25 the methods of the present invention are caused by infectious agents including, but not limited to, viruses, bacteria, fungi protozoa and parasites.

Viral diseases that can be treated or prevented by the methods of the present invention include, but are not limited 30 to, those caused by hepatitis type A, hepatitis type B, hepatitis type C, influenza, varicella, adenovirus, herpes simplex type I (HSV-I), herpes simplex type II (HSV-II), rinderpest, rhinovirus, echovirus, rotavirus, respiratory syncytial virus, papilloma virus, papova virus, 35 cytomegalovirus, echinovirus, arbovirus, huntavirus, coxsachie virus, mumps virus, measles virus, rubella virus,

polio virus, human immunodeficiency virus type I (HIV-I), and human immunodeficiency virus type II (HIV-II).

Bacterial diseases that can be treated or prevented by the methods of the present invention are caused by bacteria including, but not limited to, mycobacteria rickettsia, mycoplasma, neisseria and legionella.

Protozoal diseases that can be treated or prevented by the methods of the present invention are caused by protozoa including, but not limited to, leishmania, kokzidioa, and 10 trypanosoma.

Parasitic diseases that can be treated or prevented by the methods of the present invention are caused by parasites including, but not limited to, chlamydia and rickettsia.

15 **5.5. Target Cancers**

Cancers that can be treated or prevented by the methods of the present invention include, but not limited to human sarcomas and carcinomas, e.g., fibrosarcoma, myxosarcoma, liposarcoma, chondrosarcoma, osteogenic sarcoma, chordoma, angiosarcoma, endotheliosarcoma, lymphangiosarcoma, lymphangioendotheliosarcoma, synovioma, mesothelioma, Ewing's tumor, leiomyosarcoma, rhabdomyosarcoma, colon carcinoma, pancreatic cancer, breast cancer, ovarian cancer, prostate cancer, squamous cell carcinoma, basal cell carcinoma, adenocarcinoma, sweat gland carcinoma, sebaceous gland carcinoma, papillary carcinoma, papillary adenocarcinomas, cystadenocarcinoma, medullary carcinoma, bronchogenic carcinoma, renal cell carcinoma, hepatoma, bile duct carcinoma, choriocarcinoma, seminoma, embryonal carcinoma, Wilms' tumor, cervical cancer, testicular tumor, lung carcinoma, small cell lung carcinoma, bladder carcinoma, epithelial carcinoma, glioma, astrocytoma, medulloblastoma, craniopharyngioma, ependymoma, pinealoma, hemangioblastoma, acoustic neuroma, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma; leukemias, e.g., acute lymphocytic leukemia and acute myelocytic leukemia (myeloblastic, promyelocytic, myelomonocytic, monocytic and

erythroleukemia); chronic leukemia (chronic myelocytic (granulocytic) leukemia and chronic lymphocytic leukemia); and polycythemia vera, lymphoma (Hodgkin's disease and non-Hodgkin's disease), multiple myeloma, Waldenström's
5 macroglobulinemia, and heavy chain disease. Specific examples of such cancers are described in the sections below.

In a specific embodiment the cancer is metastatic. In another specific embodiment, the patient having a cancer is immunosuppressed by reason of having undergone anti-cancer
10 therapy (e.g., chemotherapy radiation) prior to administration of the hsp-antigenic molecule complexes of the invention.

5.5.1. Colorectal Cancer Metastatic to the Liver

15 In 1992, approximately 150,000 Americans were diagnosed with colorectal cancer and more than 60,000 died as a result of colorectal metastases. At the time of their deaths, 80 percent of patients with colorectal cancer have metastatic
20 disease involving the liver, and one-half of these patients have no evidence of other (extrahepatic) metastases. Most metastatic tumors of the liver are from gastrointestinal primaries. Unfortunately, the natural history of metastatic liver lesions carries a grave prognosis and systemic
25 chemotherapy regimens have been unable to induce significant response rates or alter length of survival (Drebin, J.A., et al., in *Current Therapy In Oncology*, ed. J.E. Niederhuber, B.C. Decker, Mosby, 1993, p.426).

Colorectal cancer initially spreads to regional lymph
30 nodes and then through the portal venous circulation to the liver, which represents the most common visceral site of metastasis. The symptoms that lead patients with colorectal cancer to seek medical care vary with the anatomical location of the lesion. For example, lesions in the ascending colon
35 frequency ulcerate, which leads to chronic blood loss in the stool.

Radical resection offers the greatest potential for cure in patients with invasive colorectal cancer. Before surgery, the CEA titer is determined. Radiation therapy and chemotherapy are used in patients with advanced colorectal cancer. Results with chemotherapeutic agents (e.g., 5-fluorouracil) are mixed and fewer than 25 percent of patients experience a greater than 50 percent reduction in tumor mass (Richards, 2d., F., et al., 1986, *J. Clin. Oncol.* 4:565).

Patients with widespread metastases have limited survival and systemic chemotherapy has little impact in this group of patients. In addition, systemically administered chemotherapy is often limited by the severity of toxicities associated with the various agents, such as severe diarrhea, mucositis and/or myelosuppression. Other techniques, including hepatic radiation, systemic chemotherapy, hepatic arterial ligation, tumor embolization and immunotherapy have all been explored, but, for the most part, have proven ineffectual in prolonging patient survival.

In a specific embodiment, the present invention provides compositions and methods for enhancing tumor specific immunity in individuals suffering from colorectal cancer metastasized to the liver, in order to inhibit the progression of the neoplastic disease. Preferred methods of treating these neoplastic diseases comprise administering a composition of autologous hsp noncovalently bound to peptide complexes, which elicits tumor-specific immunity against the tumor cells. Most specifically, the use of a composition of the invention, comprising gp96, can result in nearly complete inhibition of liver cancer growth in cancer patients, without inducing toxicity and thus providing a dramatic therapeutic effect.

Accordingly, as an example of the method of the invention, gp96 is administered to a patient diagnosed with colorectal cancer, with or without liver metastasis, via one of many different routes of administration, the preferred routes being subcutaneous at different anatomical sites, e.g., left arm, right arm, left belly, right belly, left

thigh, right thigh, etc. These routes of administration are used in sequence and the site of injection is varied for each weekly injection as described in Section 7. The preparations and use of therapeutically effective compositions for the prevention and treatment of primary and metastatic cancers are described in detail in the sections which follow and by way of example, *infra*.

5.5.2. Hepatocellular Carcinoma

Hepatocellular carcinoma is generally a disease of the elderly in the United States. Although many factors may lead to hepatocellular carcinoma, the disease is usually limited to those persons with preexisting liver disease. Approximately 60 to 80 percent of patients in the United States with hepatocellular carcinoma have a cirrhotic liver and about four percent of individuals with a cirrhotic liver eventually develop hepatocellular carcinoma (Niederhuber, J.E., (ed.), 1993, *Current Therapy in Oncology*, B.C. Decker, Mosby). The risk is highest in patients whose liver disease is caused by inherited hemochromatosis or hepatic B viral infection (Bradbear, R.A., et al., 1985, *J. Natl. Cancer Inst.* 75:81; Beasley, R.P., et al., 1981, *Lancet* 2:1129). Other causes of cirrhosis that can lead to hepatocellular carcinoma include alcohol abuse and hepatic fibrosis caused by chronic administration of methotrexate. The most frequent symptoms of hepatocellular carcinoma are the development of a painful mass in the right upper quadrant or epigastrium, accompanied by weight loss. In patients with cirrhosis, the development of hepatocellular carcinoma is preceded by ascites, portal hypertension and relatively abrupt clinical deterioration. In most cases, abnormal values in standard liver function tests such as serum aminotransferase and alkaline phosphatase are observed.

CT scans of the liver are used to determine the anatomic distribution of hepatocellular carcinoma and also provide orientation for percutaneous needle biopsy. Approximately 70 percent of patients with hepatocellular carcinoma have an

elevated serum alpha-fetoprotein concentration (McIntire, K.R., et al., 1975, *Cancer Res.* 35:991) and its concentration correlates with the extent of the disease.

Radical resection offers the only hope for cure in 5 patients with hepatocellular carcinoma. Such operative procedures are associated with five-year survival rates of 12 to 30 percent. Liver transplantation may improve survival of some younger individuals. However, most patients are not surgical candidates because of extensive cirrhosis multifocal 10 tumor pattern or scarcity of compatible donor organs. Chemotherapeutic agents have been administered either by intravenous route or through an intrahepatic arterial catheter. Such therapy has sometimes been combined with irradiation to the liver. Reductions in the size of 15 measurable tumors of 50% or more have been reported in some patients treated with either systemic doxorubicin or 5-fluorouracil. However, chemotherapy often induces immunosuppression and rarely causes the tumor to disappear completely and the duration of response is short. The 20 prognosis for patients with hepatocellular carcinoma is negatively correlated with cirrhosis and metastases to the lungs or bone. Median survival for patients is only four to six months. In another specific embodiment, the present invention provides compositions and methods for enhancing 25 specific immunity in individuals suffering from hepatocellular carcinoma in order to inhibit the progression of the neoplastic disease and ultimately irradiate all preneoplastic and neoplastic cells.

30 5.5.3. Breast Cancer

Another specific aspect of the invention relates to the treatment of breast cancer. The American Cancer Society estimated that in 1992 180,000 American women were diagnosed with breast cancer and 46,000 succumbed to the disease 35 (Niederhuber, J.E.ed. *Current Therapy in Oncology* B.C. Decker, Mosby, 1993). This makes breast cancer the second major cause of cancer death in women, ranking just behind

lung cancer. A disturbing fact is the observation that breast cancer has been increasing at a rate of 3 percent per year since 1980 (Niederhuber, J.E., ed. Current Therapy in Oncology, B.C. Decker, Mosby, (1993)). The treatment of breast cancer presently involves surgery, radiation, hormonal therapy and/or chemotherapy. Consideration of two breast cancer characteristics, hormone receptors and disease extent, has governed how hormonal therapies and standard-dose chemotherapy are sequenced to improve survival and maintain or improve quality of life. A wide range of multidrug regimens have been used as adjuvant therapy in breast cancer patients, including, but not limited to combinations of 2 cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine methotrexate, 5-fluorouracil and/or leucovorin. In a specific embodiment, the present invention provides hsp compositions and methods for enhancing specific immunity to preneoplastic and neoplastic mammary cells in women. The present invention also provides compositions and methods for preventing the development of neoplastic cells in women at enhanced risk for breast cancer, and for inhibiting cancer cell proliferation and metastasis. These compositions can be applied alone or in combination with each other or with biological response modifiers.

25 5.6. Autologous Embodiment

The specific immunogenicity of hsps derives not from hsps per se, but from the peptides bound to them. In a preferred embodiment of the invention directed to the use of autologous complexes of hsp-peptides as cancer vaccines, two of the most intractable hurdles to cancer immunotherapy are circumvented. First is the possibility that human cancers, like cancers of experimental animals, are antigenically distinct. In an embodiment of the present invention, hsps chaperone antigenic peptides of the cancer cells from which they are derived and circumvent this hurdle. Second, most current approaches to cancer immunotherapy focus on determining the CTL-recognized epitopes of cancer cell lines.

This approach requires the availability of cell lines and CTLs against cancers. These reagents are unavailable for an overwhelming proportion of human cancers. In an embodiment of the present invention directed to autologous complexes of hsp peptides, cancer immunotherapy does not depend on the availability of cell lines or CTLs nor does it require definition of the antigenic epitopes of cancer cells. These advantages make autologous hsps noncovalently bound to peptide complexes attractive and novel immunogens against cancer.

5.7. Prevention and Treatment of Primary and Metastatic Neoplastic Diseases

There are many reasons why immunotherapy as provided by the present invention is desired for use in cancer patients. First, if cancer patients are immunosuppressed and surgery, with anesthesia, and subsequent chemotherapy, may worsen the immunosuppression, then with appropriate immunotherapy in the preoperative period, this immunosuppression may be prevented or reversed. This could lead to fewer infectious complications and to accelerated wound healing. Second, tumor bulk is minimal following surgery and immunotherapy is most likely to be effective in this situation. A third reason is the possibility that tumor cells are shed into the circulation at surgery and effective immunotherapy applied at this time can eliminate these cells.

The preventive and therapeutic methods of the invention are directed at enhancing the immunocompetence of the cancer patient either before surgery, at or after surgery, and to induce tumor-specific immunity to cancer cells, with the objective being inhibition of cancer, and with the ultimate clinical objective being total cancer regression and eradication.

35

**5.8. Monitoring of Effects During
Cancer Prevention and Immunotherapy
with Hsp-peptide Complexes**

The effect of immunotherapy with hsp-antigenic molecule complexes on development and progression of neoplastic diseases can be monitored by any methods known to one skilled in the art, including but not limited to measuring: a) delayed hypersensitivity as an assessment of cellular immunity; b) activity of cytolytic T-lymphocytes *in vitro*; c) levels of tumor specific antigens, e.g., carcinoembryonic (CEA) antigens; d) changes in the morphology of tumors using techniques such as a computed tomographic (CT) scan; and e) changes in levels of putative biomarkers of risk for a particular cancer in individuals at high risk, and f) changes in the morphology of tumors using a sonogram.

5.8.1. Delayed Hypersensitivity Skin Test

Delayed hypersensitivity skin tests are of great value in the overall immunocompetence and cellular immunity to an antigen. Inability to react to a battery of common skin antigens is termed anergy (Sato, T., et al, 1995, *Clin. Immunol. Pathol.* 74:35-43).

Proper technique of skin testing requires that the antigens be stored sterile at 4°C, protected from light and reconstituted shortly before use. A 25- or 27-gauge needle ensures intradermal, rather than subcutaneous, administration of antigen. Twenty-four and 48 hours after intradermal administration of the antigen, the largest dimensions of both erythema and induration are measured with a ruler. Hypoactivity to any given antigen or group of antigens is confirmed by testing with higher concentrations of antigen or, in ambiguous circumstances, by a repeat test with an intermediate test.

5. .2. Activity of Cytolytic T-lymphocytes *In Vitro*

8x10⁶ Peripheral blood derived T lymphocytes isolated by the Ficoll-Hypaque centrifugation gradient technique, are
5 restimulated with 4x10⁴ mitomycin C treated tumor cells in 3ml RPMI medium containing 10% fetal calf serum. In some experiments, 33% secondary mixed lymphocyte culture supernatant or IL-2, is included in the culture medium as a source of T cell growth factors.

10 In order to measure the primary response of cytolytic T-lymphocytes after immunization, T cells are cultured without the stimulator tumor cells. In other experiments, T cells are restimulated with antigenically distinct cells. After six days, the cultures are tested for cytotoxicity in a 4 hour
15 ⁵¹Cr-release assay. The spontaneous ⁵¹Cr-release of the targets should reach a level less than 20%. For the anti-MHC class I blocking activity, a tenfold concentrated supernatant of W6/32 hybridoma is added to the test at a final concentration of 12.5% (Heike M., et al., *J. Immunotherapy*
20 15:165-174).

5.8.3. Levels of Tumor Specific Antigens

Although it may not be possible to detect unique tumor antigens on all tumors, many tumors display antigens that
25 distinguish them from normal cells. The monoclonal antibody reagents have permitted the isolation and biochemical characterization of the antigens and have been invaluable diagnostically for distinction of transformed from nontransformed cells and for definition of the cell lineage
30 of transformed cells. The best-characterized human tumor-associated antigens are the oncofetal antigens. These antigens are expressed during embryogenesis, but are absent or very difficult to detect in normal adult tissue. The prototype antigen is carcinoembryonic antigen (CEA), a
35 glycoprotein found on fetal gut and human colon cancer cells, but not on normal adult colon cells. Since CEA is shed from colon carcinoma cells and found in the serum, it was

originally thought that the presence of this antigen in the serum could be used to screen patients for colon cancer. However, patients with other tumors, such as pancreatic and breast cancer, also have elevated serum levels of CEA.

5 Therefore, monitoring the fall and rise of CEA levels in cancer patients undergoing therapy has proven useful for predicting tumor progression and responses to treatment.

Several other oncofetal antigens have been useful for diagnosing and monitoring human tumors, e.g., alpha-
10 fetoprotein, an alpha-globulin normally secreted by fetal liver and yolk sac cells, is found in the serum of patients with liver and germinal cell tumors and can be used as a matter of disease status.

15 **5.8.4. Computed Tomographic (CT) Scan**

CT remains the choice of techniques for the accurate staging of cancers. CT has proved more sensitive and specific than any other imaging techniques for the detection of metastases.

20

5.8.5. Measurement of Putative Biomarkers

The levels of a putative biomarker for risk of a specific cancer are measured to monitor the effect of hsp noncovalently bound to peptide complexes. For example, in
25 individuals at enhanced risk for prostate cancer, serum prostate-specific antigen (PSA) is measured by the procedure described by Brawer, M.K., et. al., 1992, J. Urol. 147:841-845, and Catalona, W.J., et al., 1993, JAMA 270:948-958; or in individuals at risk for colorectal cancer CEA is measured
30 as described above in Section 4.5.3; and in individuals at enhanced risk for breast cancer, 16- α -hydroxylation of estradiol is measured by the procedure described by Schneider, J. et al., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:3047-3051. The references cited above are incorporated by
35 reference herein in their entirety.

5.8.6. Sonogram

A Sonogram remains an alternative choice of technique for the accurate staging of cancers.

5 6. EXAMPLE: ADMINISTRATION OF HSP-PEPTIDE
COMPLEXES IN TWO UV-INDUCED CARCINOMA
MODELS IN MICE

a) Tumor models:

Two UV-induced carcinomas were studied in the C3H/HeN mice (Ward, et al., 1989, *J. Exp. Med.* 170:217): (i) the
10 highly immunogenic 6138 carcinoma, and (ii) the less immunogenic 6139ST carcinoma.

b) Gp96 preparations were prepared from the 6138 and 6139SJ carcinomas by the procedures described above in Section 5.2.3. The gp96 preparations were administered
15 without adjuvants.

6.1 Prevention Modality

(a) Materials and Method:

The ability of gp96 preparations to prevent development
20 of UV-induced carcinoma was tested. A total of six groups of female C₃H/HeN mice (obtained from the National Cancer Institute, Frederick, MD), weighing approximately 25g each, were used. Two groups of mice were given twice at a ten day interval, either (i) phosphate buffer saline (PBS), (ii) 25
25 microgram/mouse of gp96 derived from UV6138 carcinomas, or (iii) 25 microgram/mouse of gp96 derived from UV3169SJ carcinoma.

In each set, mice were challenged with 10⁷ cells from either the UV6138 carcinoma or the UV6139SJ carcinoma 15 days
30 after the second injection with PBS or gp96. Tumors were measured at 2 day intervals. Since the UV6138 tumor is a regressor tumor, mice were irradiated at 400 rad 10 days after the second injection with PBS or gp96 in order to permit growth of the tumor. The UV6139SJ challenged mice
35 were not irradiated.

b) Results

Administration of gp96 isolated from the UV6138 carcinoma rendered the mice immune to the UV6138 challenge but not the UV6139SJ challenge (Figure 1). Conversely, administration of gp96 isolated from the UV6139SJ conferred
5 resistance to the UV6139SJ cells but not to the UV6138 cells. The resistance rendered by the gp96 derived from the UV6138 against the UV6138 cells was much greater (6 out of 7 mice) than the resistance rendered by the gp96 derived from the UV6139 against the UV6139 SJ cells (2 out of 4 mice)
10 (Figure 1). These results indicate that administration of gp96 preparations derived from the two UV-induced carcinomas immunized syngeneic mice from the respective cancer cell type and that the resistance rendered was greater and more uniform against the more immunogenic carcinoma cells.

15

6.2 Treatment Modality

a) Materials and Methods

The ability of gp96 preparations to mediate therapy of pre-existing cancers was tested. Three groups of mice were
20 injected intradermally with 10^7 cells of the UV6139SJ carcinoma. The mice were kept under observation until the tumors became visible and palpable at day 4. Thereafter, the mice in the first group received no treatment, each mouse in the second group received every other day for a total of 5
25 injections of 6 micrograms each of gp96 derived from the UV6139SJ carcinoma cells, and each mouse in the third group received in a similar manner a total of 5 injections of gp96 derived from the normal liver.

b) Results

30 Tumor growth monitored as diameter width, was significantly retarded in mice treated with tumor-derived gp96 but not in mice treated with the liver-derived gp96 or in the untreated mice (Figure 2). These results indicated a therapeutic effect of gp96-complexes in the UV6139SJ
35 carcinoma model. All mice eventually succumbed to tumor growth. A scrutiny of the kinetics of tumor growth in treated and controlled mice shows that administration of

tumor-derived gp96 had an immediate inhibitory effect on tumor growth and that the effect appears to have diminished after treatment with gp96 was terminated.

5 **6.3 Measuring Generation of MHC Class I
Restricted CD8⁺ CTLs Provides An
Assay For In Vivo Tumor Rejection**

10 The effect of vaccination with hsps has been measured
thus far in the prior art by tumor rejection assays *in vivo*.
While this assay is clearly the most demanding and rigorous
15 evidence for immunogenicity, it is impractical for the
purpose of monitoring immune response in humans. We tested
the ability of tumor-derived gp96 preparations to elicit a
CD8⁺ T cell response in order to define an *in vitro* correlate
for *in vivo* tumor rejection. Mice were immunized twice with
15 20 micrograms gp96 derived from 6138 or 6139SJ cells. Mixed
lymphocyte-tumor cultures (MLTCs) generated from immunized
mice were tested in a ⁵¹Chromium release assay and showed
tumor-specific cytotoxicity for the tumor used as the source
of gp96. This cytotoxic activity could be blocked by anti-
20 MHC class I antibody K44 (Ozato, K., et al., 1985, *Proc.*
Natl. Acad. Sci. USA 82:2427) (Fig. 3A) and by anti-CD8
antibody YTS169.4 (Cobbold, S.P., et al., 1984, *Nature*
312:548) (not shown). No corresponding activity was detected
in MLTCs generated from spleens of naive mice. These results
25 demonstrate that vaccination with gp96 elicits effective
tumor-specific CTL response, which may be measured *in vitro*,
and independently of the tumor regression responses shown in
Figs. 1 and 2. In light of the general paradigm that
exogenous antigens are usually presented through MHC class II
30 molecules and elicit a helper T cell response (Townsend, A.
et al., 1989, *Ann. Rev. Immunol.* 7:601), the ability of
exogenous HSP preparations to elicit MHC class I-restricted
CTLs is unusual.

35 While testing the ability of tumor-derived gp96
preparations to elicit CTL responses, vaccination with
irradiated whole tumor cells was carried out as a positive

control. As expected, vaccination with intact irradiated 6138 cells led to vigorous tumor-specific CTL response. However, vaccination with intact irradiated 6139SJ cells did not lead to a corresponding CTL response (Fig. 3B). This result was surprising as UV-induced cancers of C3H mice are generally highly immunogenic (Kripke, M.L., 1977, *Cancer Res.* 37:1395. In view of the observation that 6139SJ cells are suitable targets for cytotoxic T cells (as seen in Fig. 3A), we deduce that they are not defective in antigen presentation; instead, their inability to elicit CTL response suggests that they are deficient in a crucial, as yet undefined step necessary specifically for priming a CTL response *in vivo*. It is most significant in this regard that although 6139SJ cells do not elicit a CTL response, gp96 preparations derived from them do so efficiently. This suggest that intact tumor cells and HSPs derived from them elicit immunity through distinct immunological pathways. The ability of gp96 preparations derived from a tumor to elicit a potent CTL response even when the tumor from which gp96 is derived is unable to do so, makes hsp preparations attractive as therapeutic vaccines.

6.4 GP96-Peptide Complexes Elicit A Memory T Cell Response

The ability to elicit a memory response is crucial for any vaccine and the ability of gp96 to elicit a memory T cell population was tested. A number of criteria, *i.e.*, radiation resistance, kinetics of appearance, loss of CD45RB and L-selectin lymphocyte surface antigens, were used to identify memory T response. In contrast to naive T cells (Schrek, R., 1961, *Ann. N.Y. Acad. Sci* 95:839), memory T cells are cycling cells (Mackay, C.R., et al, 1992, *Nature* 360:264) and like other cycling lymphocytes, are resistant to sub-lethal irradiation (Lowenthal, J.W., et al., 1991, *Leuc. Biol.* 49:388). Thus radiation-resistance can be used to distinguish naive resting T cells from activated effector and memory T cells. However, no known surface markers

distinguish activated effector T cells from memory T cells and the two are distinguishable only by the kinetics of their appearance. Activated effector T cells disappear from circulation within seven to ten days of depletion of significant quantities of antigen (Sprent, J., 1994, *Cell* 76:315); in contrast, memory T cells continue to circulate well beyond this window of time. In order to test, if vaccination with tumor-derived gp96 elicits a memory T cell response in addition to the effector response shown in Fig. 3, mice were vaccinated twice at ten day intervals, with tumor-derived gp96 and were irradiated (400 rad) twelve days after the last vaccination. Three days after irradiation, MLTCs were generated from spleens of mice and tested for tumor-specific CTL response. It was observed (Fig. 4) that similar to the response in unirradiated mice (Fig. 3A), the irradiated, gp96-vaccinated mice generated powerful, MHC class I - restricted and tumor-specific CTL responses. Under this regimen of vaccination and irradiation, the irradiation eliminates the non-memory resting T cells, while the delay between the last vaccination and generation of MCTCs eliminates activated T lymphocytes (Sprent, J., 1994, *Cell* 76:315). Thus, the observed CTL response derives from radiation-resistant memory T cells elicited by gp96 preparations. This phenomenon was also tested in tumor rejection assays *in vivo* and mice vaccinated with gp96 and irradiated were observed to resist tumor challenges up to 17 days after vaccination, even though they had been irradiated (data not shown). These observations indicate that vaccination with gp96 elicits a long-lived, radiation-resistant T cell population.

As an independent parameter for memory response, expression of CD45RB (Birkeland, M.L., et al., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:6734) on CD8⁺ lymphocytes from irradiated and non-irradiated, naive and gp96-vaccinated mice was tested (Fig. 4). In each case, lymphocytes were obtained under the same regimen as described in the preceding paragraph, i.e., fifteen days after the last vaccination

including three days after irradiation, in order to allow the activated effector cells to be depleted. It was observed that vaccination with gp96 led to relative loss of expression of CD45RB on CD8⁺ T lymphocytes in irradiated as well as non-
5 irradiated, immunized mice. Similar results were observed with L-selectin (data not shown). These results indicated that as judged from two independent sets of criteria, vaccination with gp96 elicits a memory T cell response. To the best of my knowledge, this is the first demonstration of
10 generation of a memory CTL response by vaccination with a biochemically defined, purified cancer vaccine.

**7. EXAMPLE: ADMINISTRATION OF HSP-PEPTIDE COMPLEXES
IN THE TREATMENT OF HEPATOCELLULAR
CARCINOMA**

15 Patients with hepatocellular carcinoma are injected with hsp-peptide complexes (derived from their own tumors or from other tumors) post surgery. Treatment with hsp-peptide complexes is started any time after surgery. However, if the patient has received chemotherapy, hsp-peptide complexes are
20 usually administered after an interval of four weeks or more so as to allow the immune system to recover. The immunocompetence of the patient is tested by procedures described in sections 5.7 above.

25 The therapeutic regiment of hsp-peptide complexes, for example, gp96, hsp90, hsp70 or a combination thereof, includes weekly injections of the hsp-peptide complex, dissolved in saline or other physiologically compatible solution.

30 The dosage used for hsp70 or gp96 is in the range of 10-600 micrograms, with the preferred dosage being 10-100 micrograms. The dosage used for hsp90 is in the range of 50 to 5,000 micrograms, with the preferred dosage being about 100 micrograms.

35 The route and site of injection is varied each time, for example, the first injection is given subcutaneously on the left arm, the second injection on the right arm, the third

injection on the left abdominal region, the fourth injection on the right abdominal region, the fifth injection on the left thigh, the sixth injection on the right thigh, etc. The same site is repeated after a gap of one or more injections.

5 In addition, injections are split and each half of the dose is administered at a different site on the same day.

Overall, the first four to six injections are given at weekly intervals. Subsequently, two injections are given at two-week intervals; followed by a regimen of injections at
10 monthly intervals. The effect of hsp-peptide complexes therapy is monitored by measuring: a) delayed hypersensitivity as an assessment of cellular immunity; b) activity of cytolytic T-lymphocytes *in vitro*; c) levels of tumor specific antigens, e.g., carcinoembryonic (CEA)
15 antigens; d) changes in the morphology of tumors using techniques such as a computed tomographic (CT) scan; and e) changes in putative biomarkers of risk for a particular cancer in individuals at high risk.

Depending on the results obtained, as described above
20 Section 5.7, the therapeutic regimen is developed to maintain and/or boost the immunological responses of the patient, with the ultimate goal of achieving tumor regression and complete eradication of cancer cells.

25 **8. EXAMPLE: ADMINISTRATION OF HSP-PEPTIDE COMPLEXES
 IN THE TREATMENT OF COLORECTAL CANCER**

Hsp-peptide complexes (gp96, hsp70, hsp90 or a combination thereof) are administered as adjuvant therapy and as prophylactic adjuvant therapy in patients after complete
30 reduction of colorectal cancer to eliminate undetectable micrometastases and to improve survival.

The therapeutic and prophylactic regimens used in patients suffering from colorectal cancer are the same as those described in Section 7 above for patients recovering
35 with hepatocellular carcinoma. The methods of monitoring of patients under clinical evaluation for prevention and treatment of colorectal cancer is done by procedures

described in Section 5.7. Specifically, CEA levels are measured as a useful monitor of tumor regression and/or recurrence (Mayer, R.J., et al., 1978, *Cancer* 42:1428).

5 9. **EXAMPLES: METHOD FOR RAPID PURIFICATION OF PEPTIDE-ASSOCIATED HSP70**

10 Hsp70-peptide complexes can be readily obtained from cancer cells or cells infected by an infectious agent or other cells by a rapid, one-step ADP-agarose chromatography, described below.

9.1 Method and Results

 Meth A sarcoma cells (500 million cells) were homogenized in hypotonic buffer and the lysate was
15 centrifuged at 100,000 g for 90 minutes at 4°C. The supernatant was divided into two and was applied to an ADP-agarose or an ATP-agarose column. The columns were washed in buffer and were eluted with 3 mM ADP or 3 mM ATP, respectively. The eluted fractions were analyzed by
20 SDS-PAGE: in both cases, apparently homogeneous preparations of hsp70 were obtained. However, when each of the preparations was tested for presence of peptides, the ADP-bound/eluted hsp70 preparation was found to be associated with peptides, while the ATP-bound/eluted hsp70 preparation
25 was not. (Figures. 5A and 5B)

30 The present invention is not to be limited in scope by the specific embodiments described herein. Indeed, various modifications of the invention in addition to those described herein will become apparent to those skilled in the art from the foregoing description and accompanying figures. Such modifications are intended to fall within the scope of the appended claims.

35 Various publications are cited herein, the disclosures of which are incorporated by reference in their entireties.

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A method of eliciting an immune response in a human individual comprising administering to the individual a composition comprising an amount of a complex in the range of 10 to 600 micrograms, said complex consisting essentially of a heat shock protein 70 noncovalently bound to an antigenic molecule.
2. A method of eliciting an immune response in a human individual comprising administering to the individual a composition comprising an amount of a complex in the range of 50 to 5,000 micrograms, said complex consisting essentially of a heat shock protein 90 noncovalently bound to an antigenic molecule.
3. A method of eliciting an immune response in a human individual comprising administering to the individual a composition comprising an amount of a complex in the range of 10 to 600 micrograms, said complex consisting essentially of a heat shock protein gp96 noncovalently bound to an antigenic molecule.
4. The method according to claim 1, 2 or 3 in which the individual has liver cancer, colon cancer, or breast cancer.
5. The method according to claim 1 in which the amount of the complex is in the range of 10 to 100 micrograms.
6. The method according to claim 2 in which the amount of the complex is in the range of about 100 micrograms.
7. The method according to claim 3 in which the amount of the complex is in the range of 10 to 100 micrograms.

8. The method according to claim 1, 2 or 3, further comprising administering to the individual an effective amount of a biological response modifier selected from the group consisting of interferon- α , interferon- γ , interleukin-
5 2, interleukin-4, interleukin-6, and tumor necrosis factor.

9. The method according to claim 1, 2 or 3 in which said administering step is repeated at weekly intervals.

10 10. The method according to claim 1, 2 or 3 in which said complex is administered intramuscularly, subcutaneously, intraperitoneally or intravenously.

11. The method according to claim 1, 2 or 3 in which
15 said administering step is repeated five times, the first administration being on the left arm, the second administration being on the right arm, the third administration being on the left belly, the fourth administration being on the right belly, the fifth
20 administration being on the left thigh, and the sixth administration being on the right thigh; said first through sixth administration being subcutaneously.

12. A method of treating a human individual having
25 cancer, comprising administering to the individual a composition comprising an amount of a complex in the range of 10 to 600 micrograms, said complex consisting essentially of a heat shock protein 70 noncovalently bound to an antigenic molecule.

30

13. A method of treating a human individual having cancer, comprising administering to the individual a composition comprising an amount of a complex in the range of 50 to 5,000 micrograms, said complex consisting essentially
35 of a heat shock protein 90 noncovalently bound to an antigenic molecule.

14. A method of treating a human individual having cancer, comprising administering to the individual a composition comprising an amount of a complex in the range of 10 to 600 micrograms, said complex consisting essentially of
5 a heat shock protein gp96 noncovalently bound to an antigenic molecule.

15. The method according to claim 12, 13 or 14 in which the cancer comprises a sarcoma or carcinoma, selected from
10 the group consisting of fibrosarcoma, myxosarcoma, liposarcoma, chondrosarcoma, osteogenic sarcoma, chordoma, angiosarcoma, endotheliosarcoma, lymphangiosarcoma, lymphangioendotheliosarcoma, synovioma, mesothelioma, Ewing's tumor, leiomyosarcoma, rhabdomyosarcoma, colon carcinoma,
15 pancreatic cancer, breast cancer, ovarian cancer, prostate cancer, squamous cell carcinoma, basal cell carcinoma, adenocarcinoma, sweat gland carcinoma, sebaceous gland carcinoma, papillary carcinoma, papillary adenocarcinomas, cystadenocarcinoma, medullary carcinoma, bronchogenic
20 carcinoma, renal cell carcinoma, hepatoma, bile duct carcinoma, choriocarcinoma, seminoma, embryonal carcinoma, Wilms' tumor, cervical cancer, testicular tumor, lung carcinoma, small cell lung carcinoma, bladder carcinoma, epithelial carcinoma, glioma, astrocytoma, medulloblastoma,
25 craniopharyngioma, ependymoma, pinealoma, hemangioblastoma, acoustic neuroma, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma, leukemia, lymphoma, multiple myeloma, Waldenström's macroglobulinemia, and heavy chain disease.

30

16. The method according to claim 12, in which the amount of the complex is in the range of 10 to 100 micrograms.

35 17. The method according to claim 13 in which the amount of the complex is in the range of about 100 micrograms.

18. The method according to claim 14 in which the amount of the complex is in the range of 10 to 100 micrograms.

5 19. The method according to claim 12, 13 or 14 in which the complex is prepared from cancerous tissue autologous to the individual.

20. The method according to claim 12, 13 or 14 in which
10 the complex is prepared from cancerous tissue allogeneic to the individual.

21. The method according to claim 12, 13 or 14, further comprising administering to the individual an effective
15 amount of a biological response modifier selected from the group consisting of interferon- α , interferon- γ , interleukin-2, interleukin-4, interleukin-6, and tumor necrosis factor.

22. The method according to claim 12, 13 or 14 in which
20 said administering step is repeated at weekly intervals.

23. The method according to claim 16, 17 or 18 in which said administering step is repeated five times, the first administration being on the left arm, the second
25 administration being on the right arm, the third administration being on the left belly, the fourth administration being on the right belly, the fifth administration being on the left thigh, and the sixth administration being on the right thigh; said first through
30 sixth administration being subcutaneously.

24. A method of treating a human individual having cancer comprising:

35 (a) administering to the individual a composition comprising about 25 micrograms of a complex, said complex consisting essentially of a heat shock protein gp96 noncovalently bound to a

peptide, said complex having been isolated from cancerous tissue of said individual; and
(b) repeating said administering of step (a) at weekly intervals for five weeks, the first
5 administration being on the left arm, the second administration being on the right arm, the third administration being on the left belly, the fourth administration being on the right belly, the fifth administration being on the
10 the left thigh, and the sixth administration being on the right thigh; said first through sixth administration being subcutaneously.

25. A method of preventing cancer in a human individual
15 in whom prevention of cancer is desired comprising administering to the individual a composition comprising an amount of a complex in the range of 10 to 600 micrograms, said complex consisting essentially of a heat shock protein
70 noncovalently bound to an antigenic molecule.
20

26. A method of preventing cancer in a human individual in whom prevention of cancer is desired, comprising administering to the individual a composition comprising an amount of a complex in the range of 50 to 5,000 micrograms,
25 said complex consisting essentially of a heat shock protein 90 noncovalently bound to an antigenic molecule.

27. A method of preventing cancer in a human individual in whom prevention of cancer is desired, comprising
30 administering to the individual a composition comprising an amount of a complex in the range of 10 to 600 micrograms, said complex consisting essentially of a heat shock protein gp96 noncovalently bound to an antigenic molecule.

35 28. The method according to claim 25, in which the amount of the complex is in the range of 10 to 100 micrograms.

29. The method according to claim 26, in which the amount of the complex is in the range of 100 micrograms.

30. The method according to claim 27, in which the amount of the complex is in the range of 10 to 100 micrograms.

31. The method according to claim 12, 13, or 14 in which the antigenic molecule is a peptide with which the heat shock protein is endogenously associated *in vivo*, and the complex is isolated from cancerous tissue.

32. The method according to claim 31 in which the cancerous tissue is from the individual.

15

33. The method according to claim 12, 13, or 14 in which the noncovalent complex of the heat shock protein and antigenic molecule is produced *in vitro*.

20 34. The method according to claim 33 in which the antigenic molecule is a tumor-specific antigen.

35 35. The method according to claim 25, 26, or 27 in which the antigenic molecule is a peptide with which the heat shock protein is endogenously associated *in vivo*.

36. A method of treating or preventing an infectious disease in a human individual in whom such treatment or prevention is desired comprising administering to the individual a composition comprising an amount of a complex in the range of 10 to 600 micrograms, said complex consisting essentially of a heat shock protein noncovalently bound to an antigenic molecule.

35 37. A method of treating or preventing an infectious disease in a human individual in whom such treatment or prevention is desired comprising administering to the

individual a composition comprising an amount of a complex in the range of 50 to 5,000 micrograms, said complex consisting essentially of a heat shock protein 90 noncovalently bound to an antigenic molecule.

5

38. A method of treating or preventing an infectious disease in a human individual in whom such treatment or prevention is desired comprising administering to the individual a composition comprising an amount of a complex in the range of 10 to 600 micrograms, said complex consisting essentially of a heat shock protein gp96 noncovalently bound to an antigenic molecule.

39. The method according to claim 36 in which the amount of the complex is in the range of 10 to 100 micrograms.

40. The method according to claim 37 in which the amount of the complex is in the range of about 100 micrograms.

41. The method according to claim 38 in which the amount of the complex is in the range of 10 to 100 micrograms.

25

42. The method according to claim 36, 37, or 38 in which the antigenic molecule is a peptide with which the heat shock protein is endogenously associated in cells infected with an infectious agent that causes the infectious disease.

30

43. The method according to claim 36, 37, or 38 in which the antigenic molecule is an antigen of an infectious agent that causes the infectious disease.

44. The method according to claim 43 in which the infectious agent is a virus, bacterium, protozoa, fungus, or parasite.

45. A method for measuring tumor rejection *in vivo* in an individual having a tumor comprising measuring the generation by the individual of MHC Class I-restricted CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes specific to the tumor.

5

46. A kit comprising in a container a composition comprising an amount of a complex in the range of 10 to 600 micrograms, said complex consisting essentially of a heat shock protein 70 noncovalently bound to an antigenic
10 molecule.

47. A kit comprising in a container a composition comprising an amount of a complex in the range of 50 to 5,000 micrograms, said complex consisting essentially of a heat
15 shock protein 90 noncovalently bound to an antigenic molecule.

48. A kit comprising in a container a composition comprising an amount of a complex in the range of 10 to 600
20 micrograms, said complex consisting essentially of a heat shock protein gp96 noncovalently bound to an antigenic molecule.

49. A kit comprising a plurality of containers, each
25 container having a composition comprising an amount of a complex in the range of 10 to 600 micrograms, said complex consisting essentially of a heat shock protein 70 noncovalently bound to an antigenic molecule.

30 50. The kit of claim 46 in which the amount of the complex is in the range of 10 to 100 micrograms.

51. The kit of claim 47 in which the amount of the complex is in the range of about 100 micrograms.
35

52. The kit of claim 48 in which the amount of the complex is in the range of 10 to 100 micrograms.

53. A method of purifying hsp70-peptide complexes comprising:

- 5 (a) contacting a sample containing cellular proteins with ADP affixed to a solid substrate under conditions such that hsp70 in the sample can bind to the ADP; and
- (b) eluting the hsp70 bound to the ADP in step (a).

10 54. The method according to claim 53 wherein the contacting is carried out by column chromatography over ADP-agarose.

15 55. The method according to claim 53 wherein the cell is a tumor cell.

56. The method according to claim 53 wherein the cell is infected with a virus.

20 57. The method according to claim 53 wherein the cell is infected with a bacterium.

58. The method according to claim 53 wherein the cell is infected with a protozoa.

25 59. The method according to claim 53 wherein the cell is infected with a parasite.

60. A method of purifying hsp70-peptide complexes from a cell comprising:

- 30 (a) homogenizing the cell with a hypotonic buffer solution to produce a cell lysate;
- (b) centrifuging the cell lysate to obtain a supernatant;
- 35 (c) running the supernatant over an ADP-agarose column;

- (d) washing the ADP-agarose column with a buffer containing ADP; and
- (e) collecting the hsp70-peptide complex.

5 61. A method of purifying hsp70-peptide complexes comprising:

- 10 (a) contacting a sample containing cellular proteins with a nonhydrolyzable analog of ATP affixed to a solid substrate under conditions such that hsp70 in the sample can bind to the nonhydrolyzable analog of ATP; and
- (b) eluting the hsp70 bound to the nonhydrolyzable analog of ATP in step (a).

15

20

25

30

35



FIG. 1A

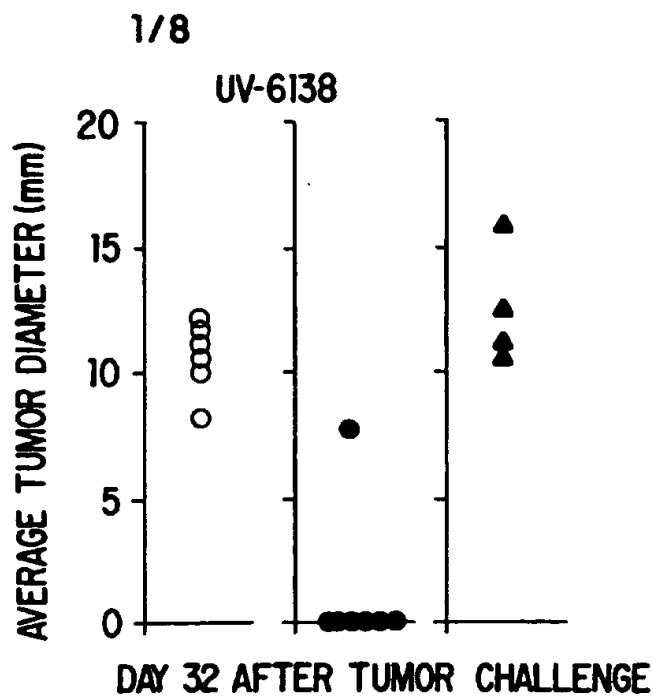


FIG. 1B

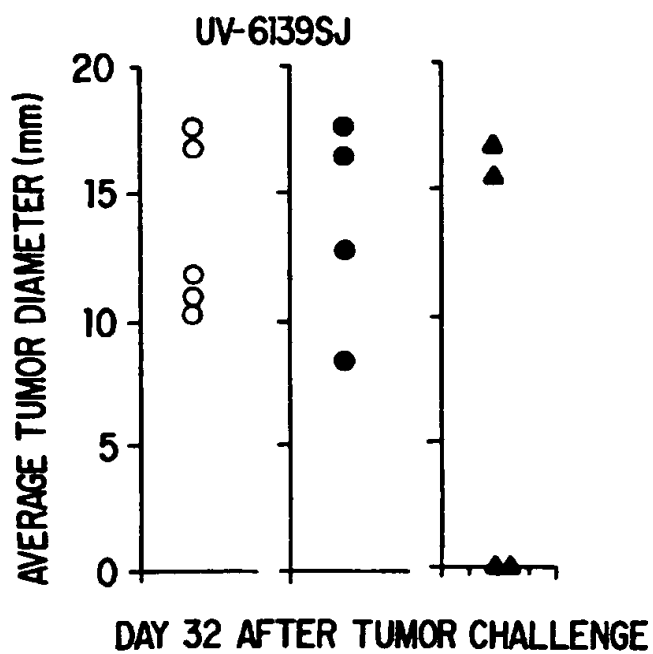


FIG. 1C

2/8

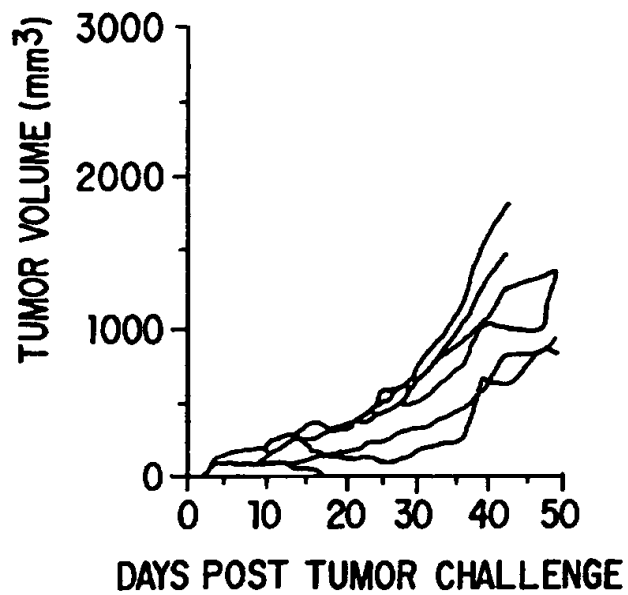


FIG. 2A

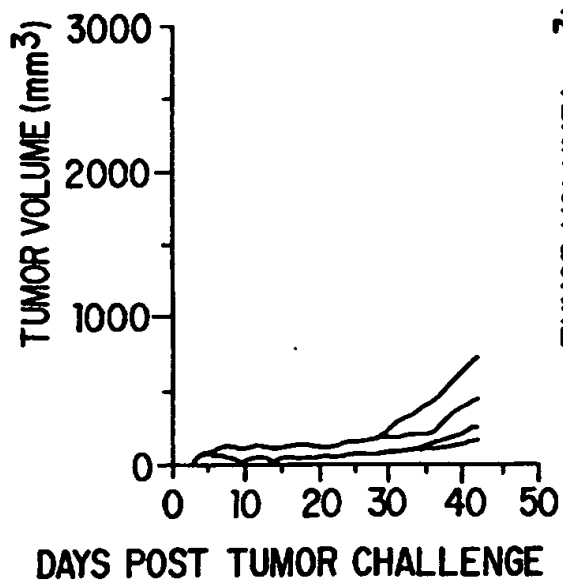


FIG. 2B

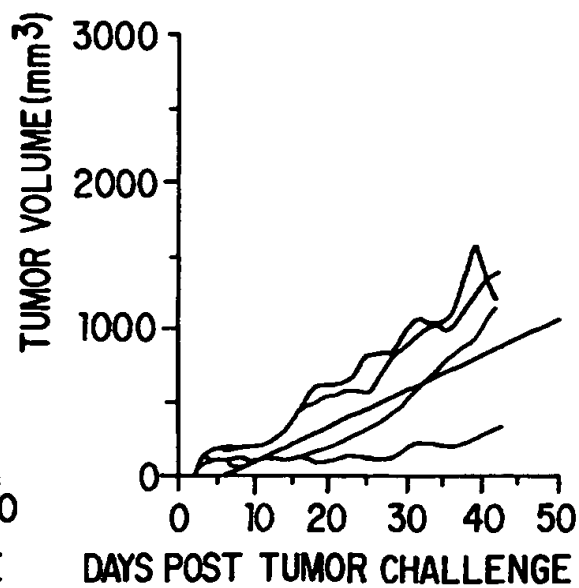


FIG. 2C

3/8

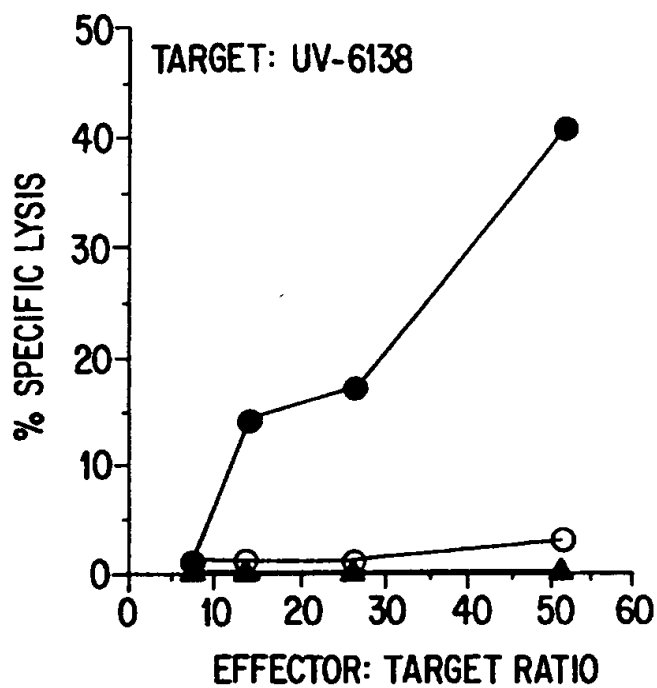


FIG. 3A

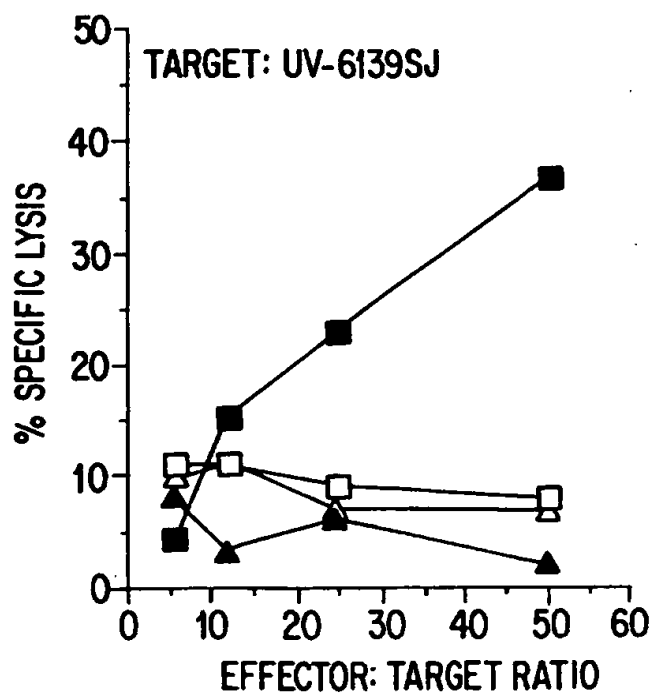


FIG. 3B

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

4/8

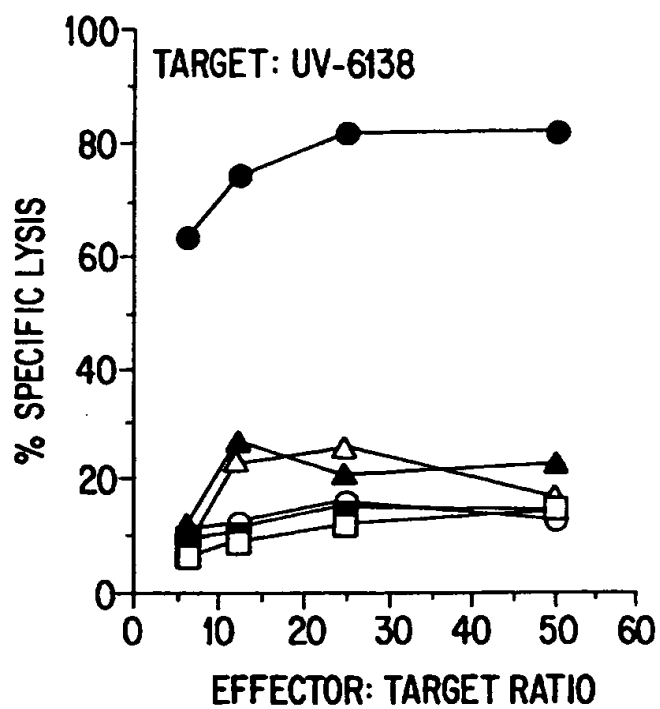


FIG. 3C

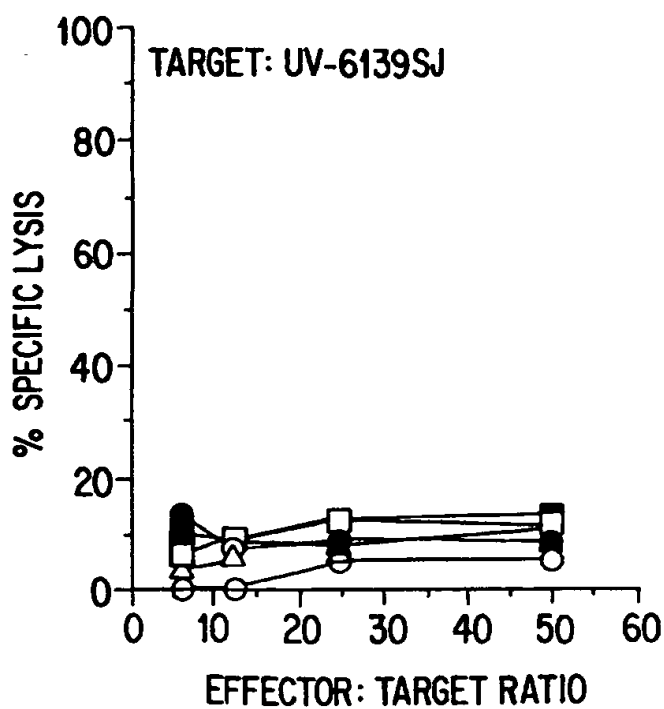


FIG. 3D

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

5/8

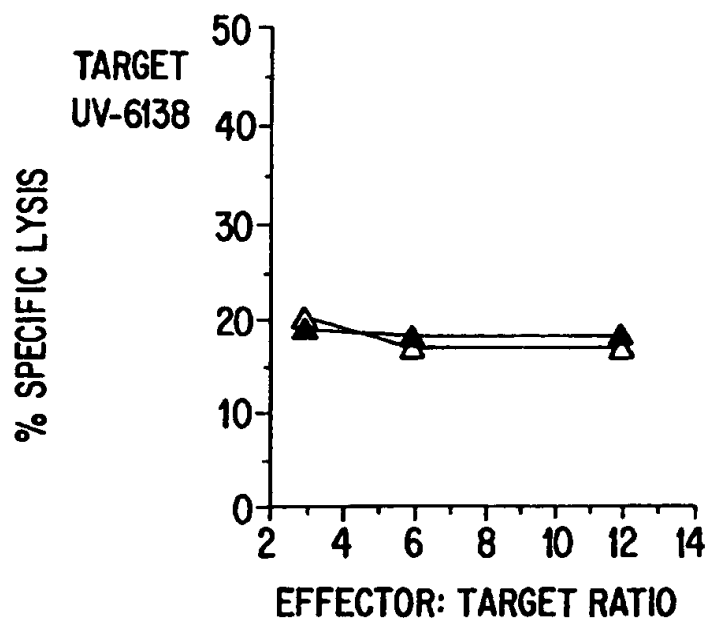


FIG. 4A

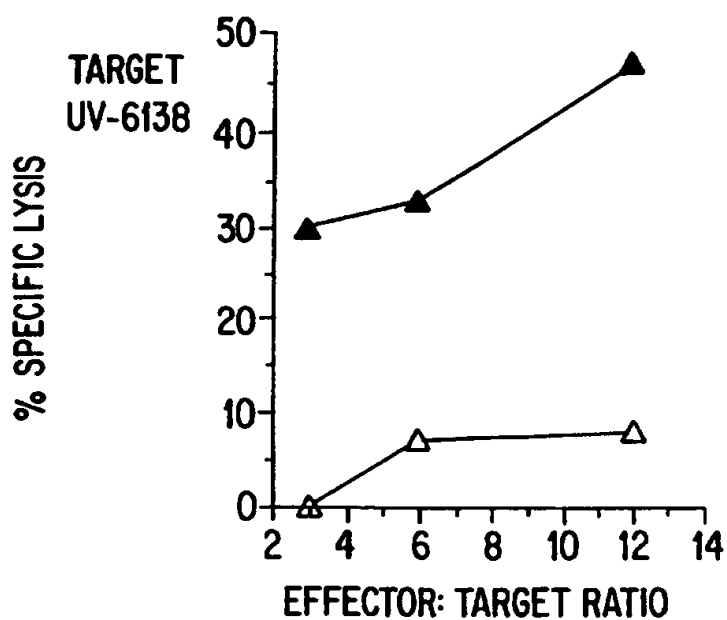


FIG. 4B

6/8

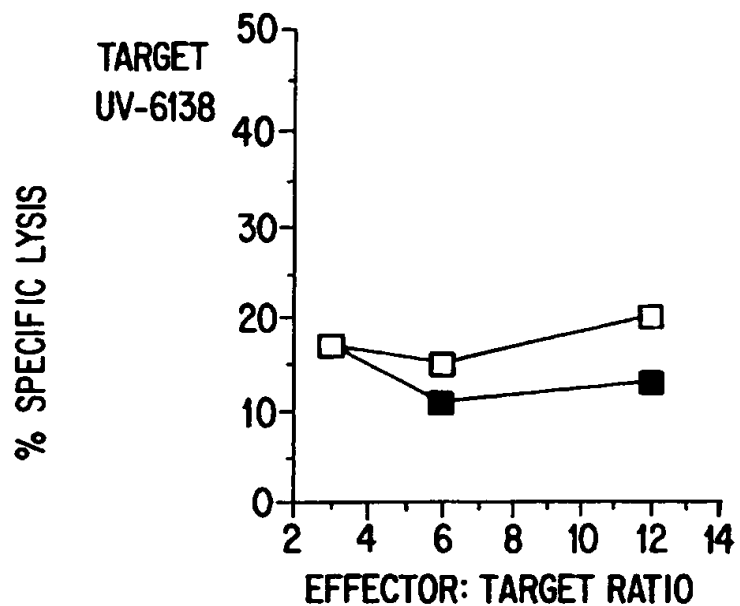


FIG. 4C

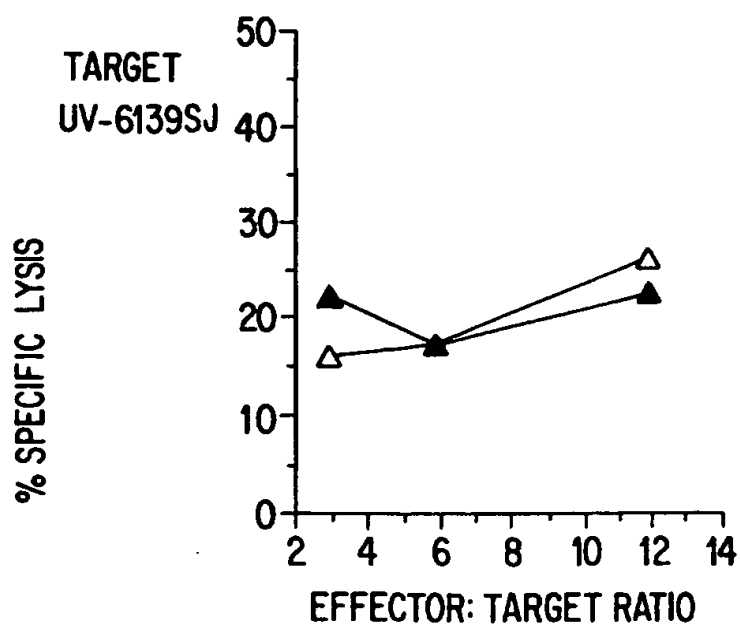


FIG. 4D

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

7/8

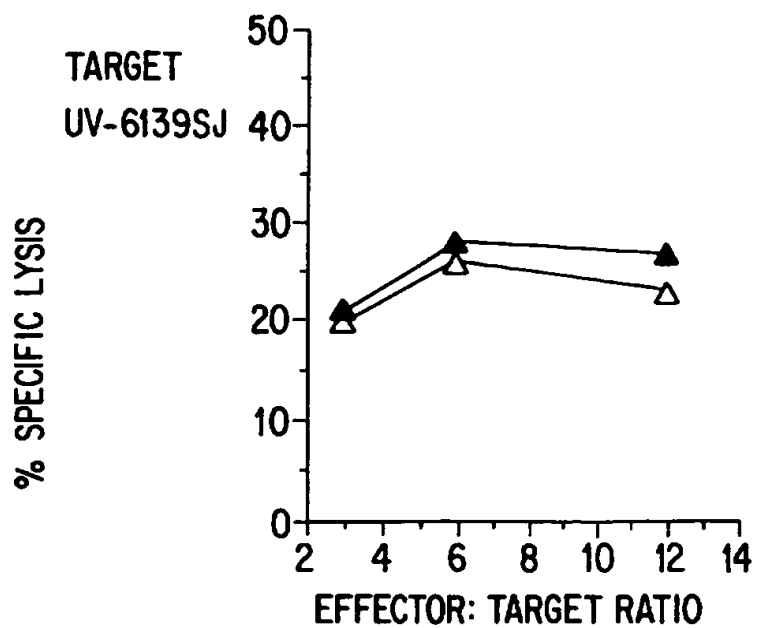


FIG. 4E

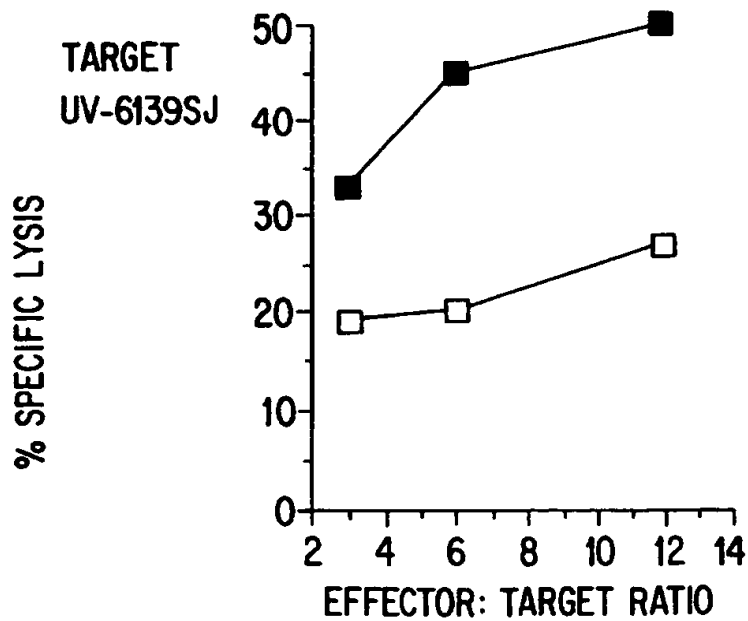


FIG. 4F

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

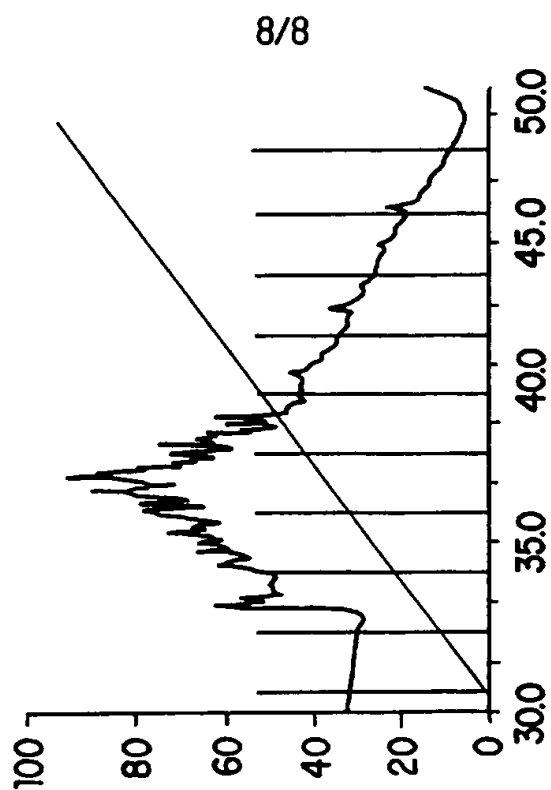


FIG. 5B

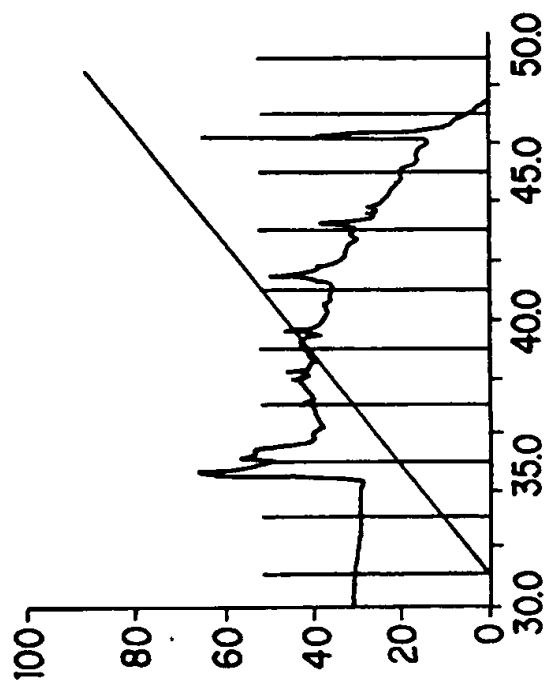


FIG. 5A

Der Antrag ist bei der zuständigen mit der in
vom Anmelder gewählten Behörde einzureich.

nalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde oder, wenn zwei oder mehr Behörden zuständig sind, bei der
Anmelder kann den Namen oder den Zweibuchstaben-Code der Behörde auf der nachstehenden Zeile angeben.

IPEA/ EP

PCT

KAPITEL II

ANTRAG AUF INTERNATIONALE VORLÄUFIGE PRÜFUNG

nach Artikel 31 des Vertrags über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens:
Der (die) Unterzeichnete(n) beantragt (beantragen), daß für die nachstehend bezeichnete internationale Anmeldung
die internationale vorläufige Prüfung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem
Gebiet des Patentwesens durchgeführt wird und benennt hiermit als ausgewählte Staaten
alle auswählbaren Staaten (soweit nichts anderes angegeben).

Von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde auszufüllen

Bezeichnung der IPEA	Eingangsdatum des ANTRAGS
----------------------	---------------------------

Feld Nr. I KENNZEICHNUNG DER INTERNATIONALEN ANMELDUNG		Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts D 1226 PCT/a
Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/02165	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 29. März 1999 (29/03/1999)	(Frühester) Prioritätstag (Tag/Monat/Jahr) 27. März 1998 (27/03/1999)
Bezeichnung der Erfindung Neue Verwendung von Hsp70-Proteinen		
Feld Nr. II ANMELDER		
Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.) MULTHOFF, Gabriele Kirchenstraße 17c 81675 München		Telefonnr.:
		Telefaxnr.:
		Fernschreibnr.:
Staatsangehörigkeit (Staat): DE	Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE	
Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)		
Staatsangehörigkeit (Staat):	Sitz oder Wohnsitz (Staat):	
Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)		
Staatsangehörigkeit (Staat):	Sitz oder Wohnsitz (Staat):	
<input type="checkbox"/> Weitere Anmelder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben.		

Feld Nr. III ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ODER ZUSTELLANSCHRIFT

Die folgende Person ist ☒ Anwalt ☐ gemeinsamer Vertreterund ☒ ist vom (von den) Anmelder(n) bereits früher bestellt worden und vertritt ihn (sie) auch für die internationale vorläufige Prüfung.☐ wird hiermit bestellt; eine etwaige frühere Bestellung eines Anwalts/gemeinsamen Vertreters wird hiermit widerrufen.☐ wird hiermit zusätzlich zu dem bereits früher bestellten Anwalt/gemeinsamen Vertreter, nur für das Verfahren vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde bestellt.

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname: bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

VOSSIUS & PARTNER
PATENTANWÄLTE
 SIEBERTSTR. 4
 81675 MÜNCHEN

Telefonnr.:

(089) 4 13 04-0

Telefaxnr.:

(089) 4 13 04-111

Fernschreibnr.:

☐ **Zustellanschrift:** Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben wird.

Feld Nr. IV GRUNDLAGE DER INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN PRÜFUNG

Erklärung betreffend Änderungen:*

1. Der Anmelder wünscht, daß die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage

☒ der internationalen Anmeldung in der ursprünglich eingereichten Fassungder Beschreibung ☐ in der ursprünglich eingereichten Fassung☐ unter Berücksichtigung der Änderungen nach Artikel 34der Patentansprüche ☐ in der ursprünglich eingereichten Fassung☐ unter Berücksichtigung der Änderungen nach Artikel 19
(ggf. zusammen mit Begleitschreiben)☐ unter Berücksichtigung der Änderungen nach Artikel 34der Zeichnungen ☐ in der ursprünglich eingereichten Fassung☐ unter Berücksichtigung der Änderungen nach Artikel 34
aufgenommen wird.2. ☐ Der Anmelder wünscht, daß jegliche nach Artikel 19 eingereichte Änderung der Ansprüche als überholt angesehen wird.3. ☐ Der Anmelder wünscht, daß der Beginn der internationalen vorläufigen Prüfung bis zum Ablauf von 20 Monaten ab dem Prioritätsdatum **aufgeschoben wird**, sofern die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde nicht eine Kopie nach Artikel 19 vorgenommener Änderungen oder eine Erklärung des Anmelders erhält, daß er keine solchen Änderungen vornehmen will (Regel 69.1 Absatz d). (Dieses Kästchen darf nur angekreuzt werden, wenn die Frist nach Artikel 19 noch nicht abgelaufen ist.)

* Wenn kein Kästchen angekreuzt wird, wird mit der internationalen vorläufigen Prüfung auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der ursprünglich eingereichten Fassung begonnen; wenn eine Kopie der Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 und/oder Änderungen der internationalen Anmeldung nach Artikel 34 bei der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde eingeht, bevor diese mit der Erstellung eines schriftlichen Bescheids oder des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts begonnen hat, wird jedoch die geänderte Fassung verwendet.

Sprache für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung: Deutsch☒ dies ist die Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht wurde.☐ dies ist die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht wurde.☐ dies ist die Sprache der Veröffentlichung der internationalen Anmeldung.☐ dies ist die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht wurde/wird.

Feld Nr. V BENENNUNG VON STAATEN ALS AUSGEWÄHLTE STAATEN

Der Anmelder benennt hiermit als ausgewählte Staaten alle auswählbaren Staaten (das heißt, alle Staaten, die bestimmt wurden und durch Kapitel II gebunden sind)
mit Ausnahme der folgenden Staaten, die der Anmelder nicht benennen möchte:

Feld Nr. VI KONTROLLISTE

Dem Antrag liegen folgende Unterlagen für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung in der in Feld Nr. IV angegebenen Sprache bei:

Von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde auszufüllen

		erhalten	nicht erhalten
1. Übersetzung der internationalen Anmeldung	: Blätter	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. Änderungen nach Artikel 34	: Blätter	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. Kopie (oder, falls erforderlich, Übersetzung) der Änderungen nach Artikel 19	: Blätter	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4. Kopie (oder, falls erforderlich, Übersetzung) einer Erklärung nach Artikel 19	: Blätter	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5. Begleitschreiben	: Blätter	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6. Sonstige (einzeln aufführen)	: Blätter	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

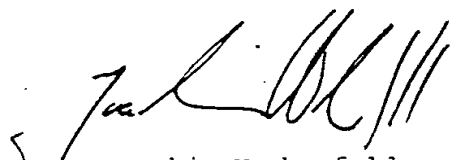
Dem Antrag liegen außerdem die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei:

- | | |
|--|---|
| 1. <input checked="" type="checkbox"/> Blatt für die Gebührenberechnung | 4. <input type="checkbox"/> Begründung für das Fehlen einer Unterschrift |
| 2. <input type="checkbox"/> unterzeichnete gesonderte Vollmacht | 5. <input type="checkbox"/> Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenzprotokoll in computerlesbarer Form |
| 3. <input type="checkbox"/> Kopie der allgemeinen Vollmacht; Aktenzeichen (falls vorhanden): | 6. <input type="checkbox"/> sonstige (einzeln aufführen): |

Feld Nr. VII UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS, ANWALTS ODER GEMEINSAMEN VERTRETERS

Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.

München, den 20. September 1999


 Dr. Joachim Wachenfeld
 European Patent Attorney

Wa/ivj

Von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde auszufüllen

- | | |
|--|---|
| 1. Datum des tatsächlichen Eingangs des ANTRAGS: | |
| 2. Geändertes Eingangsdatum des Antrags aufgrund von BERICHTIGUNGEN nach Regel 60.1 Absatz b: | |
| 3. <input type="checkbox"/> Eingangsdatum des Antrags NACH Ablauf von 19 Monaten ab Prioritätsdatum; Punkt 4 und Punkt 5, unten, finden keine Anwendung. | <input type="checkbox"/> Der Anmelder wurde entsprechend unterrichtet |
| 4. <input type="checkbox"/> Eingangsdatum des Antrags INNERHALB 19 Monate ab Prioritätsdatum wegen Fristverlängerung nach Regel 80.5. | |
| 5. <input type="checkbox"/> Das Eingangsdatum des Antrags liegt nach Ablauf von 19 Monaten ab Prioritätsdatum, der verspätete Eingang ist aber nach Regel 82 ENTSCHULDIGT. | |

Vom Internationalen Büro auszufüllen

Antrag vom IPEA erhalten am:

PCT

BLATT FÜR DIE GEBÜHRENBERECHNUNG

Anhang zum Antrag auf internationale vorläufige Prüfung

Von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung
beauftragten Behörde auszufüllen

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/02165	Von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde auszufüllen
Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts D 1226 PCT/a	Eingangsstempel der IPEA
Anmelder MULTHOFF, Gabriele	
Berechnung der vorgeschriebenen Gebühren	
1. Gebühr für die vorläufige Prüfung	EUR 1,533.00 P
2. Bearbeitungsgebühr (Anmelder aus einigen Staaten haben Anspruch auf eine Ermäßigung der Bearbeitungsgebühr um 75%. Hat der Anmelder (oder haben alle Anmelder) einen solchen Anspruch, so beträgt der in Feld H einzutragende Betrag 25 % der Bearbeitungsgebühr.)	EUR 148.00 H
3. Gesamtbetrag der vorgeschriebenen Gebühren Addieren Sie die Beträge in den Feldern P und H und tragen Sie die Summe in das nebenstehende Feld ein	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> EUR 1,681.00 </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-top: 5px;"> INSGESAMT </div>
Zahlungsart	
<input checked="" type="checkbox"/> Abbuchungsauftrag für das laufende Konto bei der IPEA (siehe unten)	<input type="checkbox"/> Barzahlung
<input type="checkbox"/> Scheck	<input type="checkbox"/> Gebührenmarken
<input type="checkbox"/> Postanweisung	<input type="checkbox"/> Kupons
<input type="checkbox"/> Bankwechsel	<input type="checkbox"/> Sonstige (einzeln angeben):
Abbuchungsauftrag (diese Zahlungsweise gibt es nicht bei allen Behörden)	
Die IPEA/ EP <input checked="" type="checkbox"/> wird beauftragt, den vorstehend angegebenen Gesamtbetrag der Gebühren von meinem laufenden Konto abzubuchen.	
<input checked="" type="checkbox"/> (dieses Kästchen darf nur angekreuzt werden, wenn die Vorschriften der IPEA über laufende Konten dieses Verfahren erlauben) wird beauftragt, Fehlbeträge oder Überzahlungen des vorstehend angegebenen Gesamtbetrags der Gebühren meinem laufenden Konto zu belasten bzw. gutzuschreiben.	
2800.0321 Kontonummer	20. September 1999 Datum (Tag/Monat/Jahr) wa/ivj
<div style="text-align: right;"> Dr. Joachim Wachenfeld Unterschrift European Patent Attorney </div>	

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESEN

Absender: MIT DER INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNG BEAUFTRAGTE BEHÖRDE

An:

VOSSIUS & PARTNER
VOSSIUS & PARTNER
Siebertstrasse 4
81675 München
ALLEMAGNE

EINGEGANGEN
Vossius & Partner

04. Juli 2000

Frist
bearb.

17.7.2000

by fax and post

PCT

MITTEILUNG ÜBER FORMLOSE
ERÖRTERUNGEN MIT DEM ANMELDER

(Regel 66.6 PCT)

Absendedatum
(Tag/Monat/Jahr) 03.07.2000

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts

D 1226 PCT/a

ANTWORT FÄLLIG innerhalb von 14 Tag(en)
ab obigem Absendedatum

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP99/02165

Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)

29/03/1999

Anmelder

MULTHOFF, Gabriele

Am 28/06/2000 fand eine formlose Erörterung zwischen der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde und dem Anmelder / dem Anwalt statt.

Aufforderung gemäß den Regeln 66.2c), 66.3 und 66.4 PCT

Die weitere Prüfung der internationalen Anmeldung hat ergeben, daß sie den Erfordernissen des PCT und dessen Ausführungsordnung aus den in der beiliegenden Niederschrift genannten Gründen (Formblatt PCT/IPEA/428) nicht genügt.

Der Anmelder wird **aufgefordert**, innerhalb der oben genannten Frist **eine schriftliche Stellungnahme** mit Änderungen **einzureichen**.

Wird keine Stellungnahme eingereicht, so wird im internationalen vorläufigen Prüfungsbericht nur die Auffassung der Behörde wiedergegeben.

Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragten Behörde



Europäisches Patentamt
D-80298 München
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Bevollmächtigter Bediensteter

Senkel, H

Telefon +49 89 2399-8071



Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens
Patent Cooperation Treaty
Traité de coopération en matière de brevets

PCT

Anmeldenummer:

PCT/EP99/02165

Niederschrift über eine telefonische formlose Erörterung mit dem Anmelder

Übermittlung einer Kopie dieser Niederschrift mit Fristsetzung von **14 Tag(en)**

Teilnehmer

Anwalt: Wachenfeld, J

Prüfer: Markopoulos, E

Zusammenfassung der Erörterung

Die am 15.5.00 eingegangenen neuen Patentansprüche wurden diskutiert, wobei in Bezug auf Anspruch 1 eine Einigung erzielt werden konnte, dahingehend, daß der Wortlaut auf "...Hsp70-Proteins, **das nicht mit Peptiden komplexiert ist und zusammen mit diesen aus Tumorzellen isoliert wird**, eines C-terminalen Fragmentes davon oder ..." abgeändert wird. Diese Änderung betrifft auch die Ansprüche 2, 7, 19, 20 und 24.

Für die Eingabe der neu formulierten Ansprüche seitens des Anmelders wurde eine Frist von 2 Wochen gesetzt.

28/06/2000

.....
Datum (Tag / Monat / Jahr)



Markopoulos, E

.....
Bevollmächtigter Bediensteter der mit der
internationalen vorläufigen Prüfung
beauftragten Behörde

VOSSIUS & PARTNER

Patentanwälte

Vossius & Partner POB 86 07 67 81634 München Germany

An das
Europäische Patentamt
München

PCT/EP99/02165
MULTHOFF, Gabriele
u. Z.: D 1226 PCT/a

PATENTANWÄLTE
EUROPEAN PATENT ATTORNEYS
EUROPEAN TRADEMARK ATTORNEYS
Dr. VOLKER VOSSIUS, Dipl.-Chem.
(bis 1992; danach in anderer Kanzlei)

Dr. PAUL TAUCHNER, Dipl.-Chem.
Dr. DIETER HEUNEMANN, Dipl.-Phys.
Dr. PETER A. RAUH, Dipl.-Chem.
Dr. GERHARD HERMANN, Dipl.-Phys.
JOSEF SCHMIDT, Dipl.-Ing.
Dr. HANS-RAINER JAENICHEN, Dipl.-Biol.
Dr. ALEXA VON UEXKÜLL, M.Sc.
Dr. RUDOLF WEINBERGER, Dipl.-Chem.
Dr. WOLFGANG BUBLAK, Dipl.-Chem.
AXEL STELLBRINK, Dipl.-Ing.
Dr. JOACHIM WACHENFELD, (Biol.)
Dr. FRIEDERIKE STOLZENBURG, Dipl.-Biol.
RAINER VIKTOR, Dipl.-Ing.

EUROPEAN PATENT ATTORNEYS
Dr. RENATE BARTH, Dipl.-Chem.
Dr. URSULA ENGLBRECHT, Dipl.-Chem.

RECHTSANWÄLTE
HELGA TREMMEL
BARBARA GUGGENMOS, Dipl.-Chem.

SIEBERTSTRASSE 4
81675 MÜNCHEN
GERMANY
TEL.: +49-89-41 30 40
FAX: +49-89-41 30 41 11 (G3/G4)
+49-89-41 30 44 00 (G3)
(Marken - Trademarks)
E-MAIL: info@vossiusandpartner.com
HOMEPAGE: www.vossiusandpartner.com

15. Mai 2000
Wa/Ka/ivj/sb

Auf den Bescheid vom 21. Februar 2000.

Als Anlage werden neue Patentansprüche 1 bis 30, in dreifacher Ausfertigung, überreicht, die die Grundlage für die weitere Sachprüfung bilden sollen.

1. ÄNDERUNGEN IN DEN PATENTANSPRÜCHEN

- 1.1 Die neuen Ansprüche 1 und 2 wurden so verändert, daß durch sie nur die Verwendung von Hsp70-Protein beansprucht wird, das nicht mit Peptiden komplexiert ist, die spezifisch auf der Oberfläche einer Tumorzelle präsentiert werden. Wir sind der Auffassung, daß diese Änderung unter anderem auf Seite 6, Zeile 29 bis 34 der Beschreibung offenbart ist. Die Ansprüche wurden außerdem dahingehend verändert, daß der C-terminale Bereich von Hsp70 über die Aminosäuresequenz definiert wird.

- 1.2 Die neuen Ansprüche 3 bis 6 entsprechen den ursprünglich eingereichten Ansprüchen 3 bis 6.
- 1.3 Im neuen Anspruch 7 wird analog zu den Änderungen in Anspruch 1 und 2 das im beanspruchten Verfahren verwendete Hsp70 präzisiert. Auch in diesem Anspruch wird der C-terminale Bereich von Hsp70 in der geänderten Fassung über die Aminosäuresequenz definiert.
- 1.4 Die neuen Ansprüche 8 bis 16 entsprechen den ursprünglich eingereichten Ansprüchen 8 bis 16.
- 1.5 Im neuen Anspruch 17 wurde der Begriff "und/" entfernt.
- 1.6 Die neuen Ansprüche 18, 19 und 20 definieren den C-terminalen Bereich von Hsp70 analog den Ansprüchen 1, 2 und 7 über die Aminosäuresequenz. Im neuen Anspruch 19 wird darüber hinaus analog den Ansprüchen 1, 2 und 7 das verwendete Hsp70-Protein präzisiert.
- 1.7 Die neuen Ansprüche 21 bis 23 entsprechen den ursprünglich eingereichten Ansprüchen.
- 1.8 Im neuen Anspruch 24 wird der C-terminale Bereich von Hsp70 nun ebenfalls über die Aminosäuresequenz definiert. Darüber hinaus werden komplexierte Hsp70-Proteine von diesem Anspruch ausgenommen.
- 1.9 Im neuen Anspruch 25 ist die Mindestkonzentration des Proteins entsprechend der Beschreibung (unter anderem Seite 14, Zeile 26 bis 30) mit 1 $\mu\text{g/ml}$ angegeben.
- 1.10 Die neuen Ansprüche 26 bis 30 entsprechen den ursprünglich eingereichten Ansprüchen.

2. NEUHEIT (Artikel 33(2) PCT)

2.1 Ansprüche 1 bis 6

In Abschnitt V 2 des vorliegenden schriftlichen Bescheids beanstandet der Prüfer, daß in den Ansprüchen 1 bis 6 auch Hsp70 beansprucht wird, das mit Tumorproteinen komplexiert ist. Der beanspruchte Gegenstand sei dadurch mit Hinblick auf die Dokumente D1, D2 und D3 nicht neu.

Diese Beanstandung trifft nicht auf den Gegenstand der neuen Ansprüche 1 bis 6 zu. Hsp70, das mit Proteinen komplexiert ist, die spezifisch auf der Oberfläche von Tumorzellen präsentiert werden, sind nicht Gegenstand der neuen Ansprüche 1 bis 6.

Der Prüfer beanstandet in diesem Zusammenhang, daß im Dokument D3 (Udono et al.) möglicherweise auch nicht-komplexiertes Hsp70 verwendet wurde (siehe Seite 5400, Zeile 2 bis 4). Wir sind im Gegensatz dazu der Auffassung, daß sich die an der angeführten Stelle von den Autoren von D3 gemachte Aussage vorrangig auf das Vorhandensein anderer Hsps bezieht. Dies wird bei genauerer Betrachtung des Textes von D3 direkt vor und hinter der angeführten Stelle deutlich.

Wir möchten weiter darauf hinweisen, daß sich aus der "occasional observation" (D3, ebd.) begleitender Proteine nicht der Umkehrschluß einer Abwesenheit von begleitenden Proteinen in allen übrigen Fällen gezogen werden kann. Wie auf Seite 5399, Spalte 2, Zeile 16-25 beschrieben, hatten die Autoren von D3 deutliche Hinweise auf eine Komplexierung der von ihnen eingesetzten Hsps mit weiteren Peptiden. Das von ihnen verwendete Verfahren zur Aufreinigung von Hsp70 ist außerdem systematisch darauf angelegt, daß eine Komplexierung der Hsps mit Peptiden erhalten bleibt (ebd.).

Die immunogene Wirksamkeit von komplexierten im Gegensatz zu nicht komplexierten Hsps wird in D3 mehrfach betont (siehe Seite 5398, Spalte 2, Zeile 7 bis 9, Zeile 14 bis 15, Zeile 21 bis 28; Seite 5401, Spalte 2, Zeile 5 bis 7, 14 bis 17, 32 bis 35; Seite 5402, Spalte 1, Zeile 10 bis 13, Zeile 20 bis 21, Spalte 2, Zeile 26 bis 30).

In Dokument D2 (Tamura et al., Seite 118, Spalte 3, Zeile 27-35) wird ebenfalls deutlich dargelegt, daß nicht mit Peptiden komplexiertem Hsp70 keine immunogene Wirkung nachgewiesen werden konnte. Die Autoren ziehen daraus den Schluß, daß die gebundenen Peptide und nicht das Hsp selbst die Ursache der Immunantwort darstellen.

Wir fassen dies dahingehend zusammen, daß für den Fachmann eine immunogene Wirkung reiner, nicht komplexierter Hsps nicht bekannt war.

2.2 Ansprüche 24 bis 28

Der Prüfer beanstandet, daß mit Hinblick auf D1, D2 und D3 auch die Ansprüche 24 bis 28 nicht neu seien. Durch die Verwendung des Wortes "enthält" seien auch an Peptide gebundenes Hsp70 in den Anspruchsgegenstand mit eingeschlossen.

Diese Beanstandung trifft nicht auf den Gegenstand der neuen Ansprüche 24 bis 28 zu. Der neue Anspruch 24 schließt Hsp70, das mit Peptiden komplexiert ist, die spezifisch auf der Oberfläche von Tumorzellen präsentiert werden, explizit vom Anspruchsgegenstand aus.

2.3 Ansprüche 7 bis 23 und 29 bis 30

Der Prüfer beanstandet an diesen Ansprüchen, daß analog den Ansprüchen 1 bis 6 ein Verfahren unter Verwendung komplexierter Hsps beansprucht wird.

Diese Beanstandung trifft nicht auf den Gegenstand der neuen Ansprüche 7 bis 23 und 29 bis 30 zu, da in den geänderten Ansprüchen nur Verfahren unter

Verwendung von Hsp70, das nicht mit Peptiden komplexiert, die spezifisch auf der Oberfläche von Tumorzellen präsentiert werden, beansprucht sind.

3. ERFINDERISCHE TÄTIGKEIT (Artikel 33(3) PCT)

Die Verwendung von nicht mit Proteinen-komplexiertem Hsp70-Protein ist für den Fachmann nicht aus dem zum Zeitpunkt der Anmeldung gültigen Stand der Technik offensichtlich. Die angeführten Dokumente D1, D2 und D3 stehen im Gegenteil in wesentlichen Teilen im deutlichen Widerspruch zur vorliegenden Erfindung, deren Inhalt damit als neu und überraschend anzusehen ist. Die vorliegenden Ansprüche sollten daher als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend angesehen werden.

4. VERSCHIEDENES

- 4.1 In ihrem schriftlichen Bescheid bemängelt der Prüfer, daß die Angaben in Klammern in den Ansprüchen 1, 2, 7, 18, 19, 20 und 24 diese Ansprüche unklar machen, da nicht erkenntlich sei, ob dieses Merkmal die Ansprüche einschränken soll.

Auf die vorliegenden neuen Ansprüche trifft diese Beanstandung nicht mehr zu. Die Ansprüche wurden dahingehend umformuliert, daß der C-Terminus von Hsp70 in den geänderten Ansprüchen über die zuvor in Klammern angegebene Aminosäuresequenz definiert wird.

- 4.2 In Punkt VIII ihres schriftlichen Bescheids beanstandet der Prüfer, daß die in Anspruch 25 angegebene Mindestkonzentration des Proteins sich nicht mit der in der Beschreibung genannten Mindestkonzentration decke.

Die im neuen Anspruch 25 angegebene Mindestkonzentration ist nun deckungsgleich mit der in der Beschreibung unter anderem auf Seite 14, Zeilen 26 bis 30 genannten Mindestkonzentration des Proteins.

- 4.3 Der Prüfer beanstandet in Abschnitt VIII 3, daß der abhängige Anspruch 17 nicht in Einklang mit den Ansprüchen 15 und 16 sei, da laut Anspruch 15 "zusätzlich ein Zytokin eingesetzt wird", und laut Anspruch 17 die Möglichkeit besteht, drei verschiedene Interleukine gleichzeitig einzusetzen.

Dieser Widerspruch wurde im neuen Anspruch 17 dadurch aufgelöst, daß nach dem Wortlaut des Anspruch 17 wahlweise eines der aufgeführten Interleukine zusätzlich eingesetzt werden kann.

5. ANTRÄGE

Aufgrund der vorstehenden Ausführungen wird der Prüfer gebeten, die in seinem Bescheid angeführten Bedenken gegen die Patentfähigkeit des Gegenstands der vorliegenden Anmeldung fallen zu lassen und einen positiven internationalen Prüfungsbericht auf der Basis der beigefügten Patentansprüche zu erlassen.



Dr. Joachim Wachenfeld
European Patent Attorney

Anlagen:

Geänderte Patentansprüche 1 bis 30, dreifach

Ansprüche

1. Verwendung eines Hsp70-Proteins, das nicht mit Peptiden komplexiert ist, die spezifisch an der Oberfläche einer Tumorzelle präsentiert werden, eines C-terminalen Fragmentes davon oder eines Derivats davon oder eines Proteins mit einer Aminosäuresequenzhomologie zum Bereich von Aminosäuren 384-641 des Hsp70-Proteins von $\geq 70\%$ zur Herstellung eines Arzneimittels, Medizinprodukts, oder medizinischen Hilfsstoffs zur Aktivierung von NK-Zellen.
2. Verwendung eines Hsp70-Proteins, das nicht mit Peptiden komplexiert ist, die spezifisch an der Oberfläche einer Tumorzelle präsentiert werden, eines C-terminalen Fragmentes davon oder eines Derivats davon oder eines Proteins mit einer Aminosäuresequenzhomologie zum Bereich von Aminosäuren 384-641 des Hsp70-Proteins von $\geq 70\%$ zur in vitro oder ex vivo Aktivierung von NK-Zellen.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Aktivierung die Induktion einer durch NK-Zellen vermittelten Immunantwort umfaßt.
4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Aktivierung eine Stimulation der Proliferation von NK-Zellen und/oder eine Steigerung der zytolytischen Aktivität von NK-Zellen einschließt.
5. Verwendung nach Anspruch 4, wobei die zytolytische Aktivität gegenüber Tumorzellen, Zellen von Patienten mit Infektionserkrankungen gesteigert ist.
6. Verwendung nach Anspruch 5, wobei die zytolytische Aktivität gegenüber Leukämiezellen, Lymphomzellen, Tumorzellen, metastasierenden Zellen solider Tumore und Zellen von Patienten mit viralen, mykotischen und/oder bakteriellen Infektionserkrankungen gesteigert ist.

7. Verfahren zur ex vivo oder in vitro Aktivierung von NK-Zellen, wobei man eine NK-Zellen enthaltende physiologische Zellsuspension mit einem Hsp70-Protein, das nicht mit Peptiden komplexiert ist, die spezifisch an der Oberfläche einer Tumorzelle präsentiert werden, einem C-terminalen Fragment davon oder einem Derivat davon oder einem Protein mit einer Aminosäuresequenzhomologie zum Bereich von Aminosäure 384-641 des Hsp70-Proteins von $\geq 70\%$ vermischt und inkubiert, um eine Aktivierung der NK-Zellen zu bewirken.
8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei die Aktivierung eine Stimulation der Proliferation der NK-Zellen und/oder eine Steigerung ihrer Zytotoxizität umfaßt.
9. Verfahren nach Anspruch 7 oder 8, wobei als NK-Zellen enthaltende physiologische Zellsuspension periphere, mononukleäre Blutzellen oder eine NK-Zellen enthaltende Fraktion hiervon eingesetzt werden.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 9, wobei die Zellsuspension weiterhin Hsp70 auf der Zelloberfläche exprimierende menschliche oder tierische Zellen enthält.
11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei als menschliche oder tierische Zellen Tumorzellen, Zellen von Patienten mit Infektionserkrankungen eingesetzt werden.
12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei als menschliche oder tierische Zellen Leukämiezellen, Lymphomzellen, Tumorzellen, metastasierende Zellen solider Tumore und Zellen von Patienten mit viralen, mykotischen und/oder bakteriellen Infektionserkrankungen eingesetzt werden.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 12, wobei die die Zellen und Proteine enthaltende physiologische Zellsuspension mindestens 3 Stunden inkubiert wird.

14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei die Inkubation 4 Tage lang vorgenommen wird.
15. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6 oder Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 14, wobei zusätzlich ein Zytokin eingesetzt wird.
16. Verwendung oder Verfahren nach Anspruch 15, wobei als Zytokin ein Interleukin eingesetzt wird.
17. Verwendung oder Verfahren nach Anspruch 16, wobei als Interleukin IL-2, IL-12 oder IL-15 eingesetzt wird.
18. Verfahren zur in vivo-Aktivierung des Immunsystems, wobei man einem Patienten eine pharmazeutisch wirksame Menge von nach dem Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 17 aktivierten NK-Zellen verabreicht, gegebenenfalls in Kombination mit oder zeitlich vor einer pharmazeutisch wirksamen Menge eines Hsp70-Proteins, eines C-terminalen Fragmentes davon oder eines Derivats davon oder eines Proteins mit einer Aminosäuresequenzhomologie zum Bereich von Aminosäure 384-641 des Hsp70-Proteins von $\geq 70\%$ verabreicht.
19. Verfahren zur in vivo-Aktivierung von NK-Zellen, wobei man einem Patienten eine pharmazeutisch wirksame Menge eines Hsp70-Proteins, das nicht mit Peptiden komplexiert ist, die spezifisch an der Oberfläche einer malignen oder infizierten Zelle präsentiert werden, eines C-terminalen Fragmentes davon oder eines Derivats davon oder eines Proteins mit einer Aminosäuresequenzhomologie zum Bereich von Aminosäure 384-641 des Hsp70-Proteins von $\geq 70\%$ verabreicht.
20. Verfahren zur Behandlung von Tumoren, Krebserkrankungen, Infektionskrankheiten oder Autoimmunerkrankungen, wobei man einem Patienten eine pharmazeutisch wirksame Menge von nach dem Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 17 aktivierten NK-Zellen und/oder eines Hsp70-Proteins, eines C-terminalen Fragmentes davon oder eines Derivats

davon oder eines Proteins mit einer Aminosäuresequenzhomologie zum Bereich von Aminosäure 384-641 des Hsp70-Proteins von $\geq 70\%$ verabreicht.

21. Verfahren nach Anspruch 20, wobei der Tumor ein solider Tumor oder eine Metastase ist.
22. Verfahren nach Anspruch 20, wobei die Krebserkrankung Leukämie oder ein Lymphom ist.
23. Verfahren nach Anspruch 20, wobei die Infektionskrankheit viralen, mykologischen oder bakteriellen Ursprungs ist.
24. Arzneimittel, Medizinprodukt oder medizinischer Hilfsstoff das/der ein Hsp70-Protein, ein C-terminales Fragment davon oder ein Derivat davon oder ein Protein mit einer Aminosäuresequenzhomologie zum Bereich von Aminosäure 384-641 des Hsp70-Proteins von $\geq 70\%$ und/oder von nach dem Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 17 aktivierten NK-Zellen in einer therapeutisch wirksamen Menge sowie gegebenenfalls übliche Träger- und/oder Hilfsstoffe enthält mit Ausnahme von Hsp70-Protein, das mit Peptiden komplexiert ist, die spezifisch auf der Oberfläche einer malignen oder infizierten Zelle präsentiert werden.
25. Arzneimittel, Medizinprodukt oder medizinischer Hilfsstoff nach Anspruch 24, wobei das Protein in einer Konzentration von mindestens $1 \mu\text{g/ml}$, bevorzugt bis zu $1000 \mu\text{g/ml}$, vorliegt.
26. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6 oder Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 23 oder Arzneimittel, Medizinprodukt oder medizinischer Hilfsstoff nach Anspruch 24 oder 25, wobei das Hsp70-Protein ein humanes Protein ist.
27. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6 oder 26 oder Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 23 oder 26 oder Arzneimittel, Medizinprodukt oder medizinischer Hilfsstoff nach einem der Ansprüche 24 bis 26, wobei das

Hsp70-Protein oder dessen Fragment oder Derivat ein rekombinantes Protein ist.

28. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, 26 oder 27 oder Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 23, 26 oder 27 oder Arzneimittel, Medizinprodukt oder medizinischer Hilfsstoff nach einem der Ansprüche 24 bis 27, wobei das Hsp70-Protein das C-terminale Fragment die Aminosäuren 384 bis 561 von menschlichem Hsp70 oder den entsprechenden Bereich aus einem anderem Hsp70 umfaßt, das die erfindungsgemäßen Wirkungen umfaßt.
29. Verwendung der nach einem Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche behandelten NK-Zellen zur Therapie von Tumorerkrankungen, und/oder Infektionserkrankungen.
30. Verwendung nach Anspruch 29, wobei die Therapie durch Reinfundierung der behandelten NK-Zellen erfolgt.

VOSSIUS & PARTNER

Patentanwälte

Vossius & Partner POB 86 07 67 81634 München Germany

An das
Europäische Patentamt
München

PATENTANWÄLTE
EUROPEAN PATENT ATTORNEYS
EUROPEAN TRADEMARK ATTORNEYS
Dr. VOLKER VOSSIUS, Dipl.-Chem.
(bis 1992; danach in anderer Kanzlei)

Dr. PAUL TAUCHNER, Dipl.-Chem.
Dr. DIETER HEUNEMANN, Dipl.-Phys.
Dr. PETER A. RAUH, Dipl.-Chem.
Dr. GERHARD HERMANN, Dipl.-Phys.
JOSEF SCHMIDT, Dipl.-Ing.
Dr. HANS-RAINER JAENICHEN, Dipl.-Biol.
Dr. ALEXA VON UEXKÜLL, M. Sc.
Dr. RUDOLF WEINBERGER, Dipl.-Chem.
Dr. WOLFGANG BUBLAK, Dipl.-Chem.
AXEL STELLBRINK, Dipl.-Ing.
Dr. JOACHIM WACHENFELD, (Biol.)
Dr. FRIEDERIKE STOLZENBURG, Dipl.-Biol.
RAINER VIKTOR, Dipl.-Ing.

EUROPEAN PATENT ATTORNEYS
Dr. RENATE BARTH, Dipl.-Chem.
Dr. URSULA ENGLBRECHT, Dipl.-Chem.

RECHTSANWÄLTE
HELGA TREMMEL
BARBARA GUGGENMOS, Dipl.-Chem.
DR. THURE SCHUBERT

SIEBERTSTRASSE 4
81675 MÜNCHEN
GERMANY
TEL.: +49-89-41 30 40
FAX: +49-89-41 30 41 11 (G3/G4)
+49-89-41 30 44 00 (G3)
(Marken - Trademarks)

E-MAIL: info@vossiusandpartner.com
HOMEPAGE: www.vossiusandpartner.com

PCT/EP99/02165
MULTHOFF, Gabriele
u. Z.: D 1226 PCT/a

12. Juli 2000
Wa/Ba/Ka/ses

Auf den Bescheid vom 3. Juli 2000:

Als Anlage werden neue Patentansprüche 1 bis 30, in dreifacher Ausfertigung, überreicht, die die Grundlage für die weitere Sachprüfung bilden sollen.

1. ÄNDERUNGEN IN DEN PATENTANSPRÜCHEN

Ausgehend von den formlosen telefonischen Erörterungen vom 28. Juni 2000 und vom 10. Juli 2000 und um klarzustellen, daß das Hsp70-Protein nicht nur aus Tumorzellen isoliert werden kann, wurden die neuen Ansprüche 1, 2, 7, 19, 20 und 24 dahingehend abgeändert, daß sie sich auf ein Hsp70-Protein beziehen, das nicht mit Peptiden komplexiert ist, wenn es zusammen mit diesen aus Tumorzellen isoliert wurde. Wir sind der Auffassung, daß die

vorliegende Formulierung das erfindungsgemäße Hsp70-Protein korrekt wiedergibt und verweisen in diesem Zusammenhang auf Seite 16, Zeilen 4 bis 10 und Seite 6, Zeilen 29 bis 34 der Beschreibung.

Patentansprüche 3 bis 6, 8 bis 18, 21 bis 23 und 25 bis 30 entsprechen den bereits am 15. Mai 2000 eingereichten Ansprüchen.

2. ANTRÄGE

Aufgrund der Ausführungen in unserem Schreiben vom 15. Mai 2000 und den aufgrund der telefonischen formlosen Erörterungen vom 28. Juni 2000 und 19. Juli 2000 durchgeführten und in diesem Schreiben erläuterten Änderungen wird die Prüferin gebeten, die in ihrem Bescheid vom 21. Februar 2000 angeführten Bedenken gegen die Patentfähigkeit des Gegenstands der vorliegenden Anmeldung fallen zu lassen und einen positiven internationalen Prüfungsbericht auf Grundlage der beigelegten Patentansprüche zu erlassen.



Dr. Renate Barth
European Patent Attorney

Anlage:
Geänderte Patentansprüche 1 bis 30, dreifach

Ansprüche

1. Verwendung eines Hsp70-Proteins, das nicht mit Peptiden komplexiert ist, wenn es zusammen mit diesen aus Tumorzellen isoliert wurde, eines C-terminalen Fragmentes davon oder eines Derivats davon oder eines Proteins mit einer Aminosäuresequenzhomologie zum Bereich von Aminosäuren 384-641 des Hsp70-Proteins von $\geq 70\%$ zur Herstellung eines Arzneimittels, Medizinprodukts, oder medizinischen Hilfsstoffs zur Aktivierung von NK-Zellen.
2. Verwendung eines Hsp70-Proteins, das nicht mit Peptiden komplexiert ist, wenn es zusammen mit diesen aus Tumorzellen isoliert wurde, eines C-terminalen Fragmentes davon oder eines Derivats davon oder eines Proteins mit einer Aminosäuresequenzhomologie zum Bereich von Aminosäuren 384-641 des Hsp70-Proteins von $\geq 70\%$ zur in vitro oder ex vivo Aktivierung von NK-Zellen.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Aktivierung die Induktion einer durch NK-Zellen vermittelten Immunantwort umfaßt.
4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Aktivierung eine Stimulation der Proliferation von NK-Zellen und/oder eine Steigerung der zytolytischen Aktivität von NK-Zellen einschließt.
5. Verwendung nach Anspruch 4, wobei die zytolytische Aktivität gegenüber Tumorzellen, Zellen von Patienten mit Infektionserkrankungen gesteigert ist.
6. Verwendung nach Anspruch 5, wobei die zytolytische Aktivität gegenüber Leukämiezellen, Lymphomzellen, Tumorzellen, metastasierenden Zellen solider Tumore und Zellen von Patienten mit viralen, mykotischen und/oder bakteriellen Infektionserkrankungen gesteigert ist.

7. Verfahren zur ex vivo oder in vitro Aktivierung von NK-Zellen, wobei man eine NK-Zellen enthaltende physiologische Zellsuspension mit einem Hsp70-Protein, das nicht mit Peptiden komplexiert ist, wenn es zusammen mit diesen aus Tumorzellen isoliert wurde, einem C-terminalen Fragment davon oder einem Derivat davon oder einem Protein mit einer Aminosäuresequenzhomologie zum Bereich von Aminosäure 384-641 des Hsp70-Proteins von $\geq 70\%$ vermischt und inkubiert, um eine Aktivierung der NK-Zellen zu bewirken.
8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei die Aktivierung eine Stimulation der Proliferation der NK-Zellen und/oder eine Steigerung ihrer Zytotoxizität umfaßt.
9. Verfahren nach Anspruch 7 oder 8, wobei als NK-Zellen enthaltende physiologische Zellsuspension periphere, mononukleäre Blutzellen oder eine NK-Zellen enthaltende Fraktion hiervon eingesetzt werden.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 9, wobei die Zellsuspension weiterhin Hsp70 auf der Zelloberfläche exprimierende menschliche oder tierische Zellen enthält.
11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei als menschliche oder tierische Zellen Tumorzellen, Zellen von Patienten mit Infektionserkrankungen eingesetzt werden.
12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei als menschliche oder tierische Zellen Leukämiezellen, Lymphomzellen, Tumorzellen, metastasierende Zellen solider Tumore und Zellen von Patienten mit viralen, mykotischen und/oder bakteriellen Infektionserkrankungen eingesetzt werden.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 12, wobei die Zellen und Proteine enthaltende physiologische Zellsuspension mindestens 3 Stunden inkubiert wird.
14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei die Inkubation 4 Tage lang vorgenommen wird.

15. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6 oder Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 14, wobei zusätzlich ein Zytokin eingesetzt wird.
16. Verwendung oder Verfahren nach Anspruch 15, wobei als Zytokin ein Interleukin eingesetzt wird.
17. Verwendung oder Verfahren nach Anspruch 16, wobei als Interleukin IL-2, IL-12 oder IL-15 eingesetzt wird.
18. Verfahren zur in vivo-Aktivierung des Immunsystems, wobei man einem Patienten eine pharmazeutisch wirksame Menge von nach dem Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 17 aktivierten NK-Zellen verabreicht, gegebenenfalls in Kombination mit oder zeitlich vor einer pharmazeutisch wirksamen Menge eines Hsp70-Proteins, eines C-terminalen Fragmentes davon oder eines Derivats davon oder eines Proteins mit einer Aminosäuresequenzhomologie zum Bereich von Aminosäure 384-641 des Hsp70-Proteins von $\geq 70\%$ verabreicht.
19. Verfahren zur in vivo-Aktivierung von NK-Zellen, wobei man einem Patienten eine pharmazeutisch wirksame Menge eines Hsp70-Proteins, das nicht mit Peptiden komplexiert ist, wenn es zusammen mit diesen aus Tumorzellen isoliert wurde, eines C-terminalen Fragmentes davon oder eines Derivats davon oder eines Proteins mit einer Aminosäuresequenzhomologie zum Bereich von Aminosäure 384-641 des Hsp70-Proteins von $\geq 70\%$ verabreicht.
20. Verfahren zur Behandlung von Tumoren, Krebserkrankungen, Infektionskrankheiten oder Autoimmunerkrankungen, wobei man einem Patienten eine pharmazeutisch wirksame Menge von nach dem Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 17 aktivierten NK-Zellen und/oder eines Hsp70-Proteins, das nicht mit Peptiden komplexiert ist, wenn es zusammen mit diesen aus Tumorzellen isoliert wurde, eines C-terminalen Fragmentes davon oder eines Derivats davon oder eines Proteins mit einer

Aminosäuresequenzhomologie zum Bereich von Aminosäure 384-641 des Hsp70-Proteins von $\geq 70\%$ verabreicht.

21. Verfahren nach Anspruch 20, wobei der Tumor ein solider Tumor oder eine Metastase ist.
22. Verfahren nach Anspruch 20, wobei die Krebserkrankung Leukämie oder ein Lymphom ist.
23. Verfahren nach Anspruch 20, wobei die Infektionskrankheit viralen, mykologischen oder bakteriellen Ursprungs ist.
24. Arzneimittel, Medizinprodukt oder medizinischer Hilfsstoff das/der ein Hsp70-Protein, ein C-terminales Fragment davon oder ein Derivat davon oder ein Protein mit einer Aminosäuresequenzhomologie zum Bereich von Aminosäure 384-641 des Hsp70-Proteins von $\geq 70\%$ und/oder von nach dem Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 17 aktivierten NK-Zellen in einer therapeutisch wirksamen Menge sowie gegebenenfalls übliche Träger- und/oder Hilfsstoffe enthält mit Ausnahme von Hsp70-Protein, das mit Peptiden komplexiert ist, wenn es zusammen mit diesen aus Tumorzellen isoliert wurde.
25. Arzneimittel, Medizinprodukt oder medizinischer Hilfsstoff nach Anspruch 24, wobei das Protein in einer Konzentration von mindestens $1 \mu\text{g/ml}$, bevorzugt bis zu $1000 \mu\text{g/ml}$, vorliegt.
26. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6 oder Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 23 oder Arzneimittel, Medizinprodukt oder medizinischer Hilfsstoff nach Anspruch 24 oder 25, wobei das Hsp70-Protein ein humanes Protein ist.
27. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6 oder 26 oder Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 23 oder 26 oder Arzneimittel, Medizinprodukt oder medizinischer Hilfsstoff nach einem der Ansprüche 24 bis 26, wobei das

Hsp70-Protein oder dessen Fragment oder Derivat ein rekombinantes Protein ist.

28. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, 26 oder 27 oder Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 23, 26 oder 27 oder Arzneimittel, Medizinprodukt oder medizinischer Hilfsstoff nach einem der Ansprüche 24 bis 27, wobei das Hsp70-Protein das C-terminale Fragment die Aminosäuren 384 bis 561 von menschlichem Hsp70 oder den entsprechenden Bereich aus einem anderem Hsp70 umfaßt, das die erfindungsgemäßen Wirkungen umfaßt.
29. Verwendung der nach einem Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche behandelten NK-Zellen zur Therapie von Tumorerkrankungen, und/oder Infektionserkrankungen.
30. Verwendung nach Anspruch 29, wobei die Therapie durch Reinfundierung der behandelten NK-Zellen erfolgt.

Neue PCT Patentanmeldung
Multhoff, Gabriele
U. Z.: D 1226 PCT

Neue Verwendung von Hsp70 Protein

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Hsp70-Protein oder Fragmenten davon zur Aktivierung von NK-Zellen, Arzneimittel, Medizinprodukte oder medizinische Hilfsstoffe, die ein Hsp70-Protein oder Fragmente davon oder aktivierte NK-Zellen enthalten, Verfahren zur Aktivierung von NK-Zellen, sowie medizinische Verwendungen der durch das erfindungsgemäße Verfahren erhaltenen Produkte.

Chaperone sind für eine Anzahl fundamentaler Prozesse in der Zelle notwendig. Insbesondere ist bekannt, daß sie dem Zellstreß entgegenwirken. Die am besten untersuchte Klasse von Chaperonen ist die Gruppe der Hitzeschock-Proteine (HSP) mit einem Molekulargewicht von 70 kDa (Multhoff et al., Cell Stress & Chaperones 1 (3) (1996), 167). Diese Proteine sind evolutionär hochkonserviert. Sie binden intrazellulär an nicht gefaltete oder nicht korrekt gefaltete Polypeptide, stabilisieren sie und inhibieren auf diese Weise deren Aggregation oder ermöglichen eine Transmembran-Translokation. Hsp70 ist sowohl im Zellkern, im Zytosol und an der Zelloberfläche bestimmter Tumorzellen lokalisiert. Neben ihrer intrazellulären Aufgabe als Chaperone scheinen die Mitglieder der HSP70-Familie an der Stimulierung des Immunsystems beteiligt zu sein, z. B. entzündlicher Prozesse unter Beteiligung von Pathogenen und an der zellulären anti-Tumorimmunantwort in vivo und in vitro. Entsprechend sind im Stand der Technik therapeutische Verwendungsmöglichkeiten von Hitzeschockproteinen dargestellt worden. So wird in der WO 97/10000 der Einsatz von Komplexen, die aus einem Hitzeschockprotein und einem an dieses Protein nicht-kovalent gebundenem, exogenem Antigenmolekül (Peptid) bestehen, zur Prävention und Behandlung von Tumor- und Infektionserkrankungen beschrieben. Die mit Hitzeschockproteinen im Komplex vorliegenden Antigene stammen

aus Tumorzellen. Sie weisen die gemeinsame Eigenschaft auf, eine Immunantwort zu induzieren. Multhoff et al., Biol. Chem. 379 (1998), 295-300 ordnen HSPs, darunter Hsp70 eine Rolle in der Erkennung durch nicht-MHC-restringierte Effektorzellen, darunter NK-Zellen, zu. Insbesondere wird herausgestellt, daß NK-Zellen auf der Oberfläche von Tumorzellen präsentierte Hsp70-Moleküle erkennen und die Tumorzellen sodann lysieren. Ein weiterer Ansatz zur Therapie von Krebserkrankungen wurde von Tamura und Kollegen (Tamura et al., Science 278 (1997), 117-123) vorgestellt. Sie konnten belegen, daß Tumor-tragende Mäuse dann erfolgreich mit Hitzeschockproteinpräparationen behandelt werden können, wenn diese aus autologen Tumoren stammen. Präparationen aus nicht-autologen Tumoren oder aus Normalgewebe hingegen führen nicht zur Regression der Tumore (Blachere et al., J. Exp. Med. 186 (1997) 1315-1322). Die HSPs sind in der Studie von Tamura et al. mit einer Vielzahl nicht näher identifizierter Peptide komplexiert. Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß der Stand der Technik eine immunologische Aktivität von HSP-Molekülen belegt, wenn diese entweder mit Peptiden komplexiert sind und/oder auf der Oberfläche von Zellen wie Tumorzellen präsentiert werden. Obwohl somit das Potential von Hitzeschockproteinen bei der Bekämpfung unterschiedlicher Erkrankungen in erster Näherung erkannt ist, hängt der erfolgreiche therapeutische Einsatz in der Regel jedoch von der Präparation bestimmter Komplexe oder Zellaufbereitungen sowie von der Menge des Ausgangsmaterials (Tumormaterials) ab. Ein universeller, patientenunabhängiger Einsatz dieser Komplexe oder Zellaufbereitungen ist nur schwer vorstellbar.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war demzufolge, neue Mittel und Wege für die Nutzung des immunologischen Potentials von Hitzeschockproteinen bereitzustellen, die unbelastet von den vorstehend genannten aus dem Stand der Technik bekannten Nachteilen sind.

Diese Aufgabe wird durch die in den Ansprüchen dargestellten

Ausführungsformen gelöst.

Somit betrifft die Erfindung die Verwendung eines Hsp70-Proteins, eines carboxy-terminalen (C-terminalen) Fragmentes davon oder eines Derivats davon oder eines Proteins mit einer Aminosäuresequenzhomologie zum C-terminalen Bereich des Hsp70-Proteins von $\geq 70\%$ zur Herstellung eines Arzneimittels, Medizinproduktes oder medizinischen Hilfsstoffes zur Aktivierung von NK-Zellen.

Arzneimittel sind erfindungsgemäß als Stoffe und Zubereitungen aus Stoffen definiert, die dazu bestimmt sind, durch Anwendung am oder im menschlichen Körper Krankheiten, Leiden, Körperschäden oder krankhafte Beschwerden zu heilen, zu lindern, zu verhüten oder zu erkennen.

Medizinprodukte sind erfindungsgemäß alle einzeln oder miteinander verbunden verwendeten Stoffe und Zubereitungen aus Stoffen oder andere Gegenstände, die vom Hersteller zur Anwendung für Menschen mittels ihrer Funktionen zum Zwecke der Erkennung, Verhütung, Überwachung, Behandlung oder Linderung von Krankheiten zu dienen bestimmt sind und deren bestimmungsgemäße Hauptwirkung im oder am menschlichen Körper weder durch pharmakologisch oder immunologisch wirkende Mittel noch durch Metabolismus erreicht wird, deren Wirkungsweise aber durch solche Mittel unterstützt werden kann.

Medizinische Hilfsstoffe sind erfindungsgemäß solche Stoffe, die zur Produktion (als aktive Ingredienzien) von Arzneimitteln eingesetzt werden.

Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung eines Hsp70-Proteins, eines C-terminalen Fragmentes davon oder eines Derivats davon oder eines Proteins mit einer Aminosäuresequenzhomologie zum C-terminalen Bereich (Aminosäuren 384-641) des Hsp70-Proteins von $\geq 70\%$ zur ex vivo oder in vitro Aktivierung von NK-Zellen.

Der Begriff "Hsp70-Protein" erfaßt erfindungsgemäß eukaryontische Hitzeschockproteine, deren Expression durch Hitze, aber auch durch eine Vielzahl anderer Reagenzien wie z.B. Aminosäure-Analoga, Schwermetalle, Ionophore oder Zellgifte induzierbar ist, wobei der Faktor der Steigerung der Expression durch die Induktion im Verhältnis zur konstitutiven Expression mindestens 5 beträgt. Die beiliegende Figur 5 zeigt den Aufbau eines Hsp70-Proteins bestehend aus einer N-terminalen ATPase Domäne und einer C-terminalen Substrat-Bindungsdomäne des Proteins. Die vollständige Aminosäuresequenz ist veröffentlicht in Milner, et al., Immunogenetics 32 (4) (1990), 242-251.

Der Begriff "carboxy-terminale[s] (C-terminale[s]) Fragment" des Hsp70-Proteins umfaßt erfindungsgemäß (Poly)peptide, die eine Aminosäuresequenz aus dem Bereich der Aminosäuren 384-641 des menschlichen Hsp70 aufweisen. Umfaßt von der vorliegenden Erfindung sind auch Fragmente des C-terminalen Fragmentes 384-641. In anderen Ausführungsformen sind mit diesem Begriff (Poly)peptide erfaßt, die aus dem Bereich eines anderen, von dem erfindungsgemäß verwendeten Begriff "Hsp70-Protein" erfaßten Proteins stammen, der zu dem genannten C-terminalen Bereich des menschlichen Hsp70-Proteins homolog ist. Die erfindungsgemäß verwendeten Fragmente des Hsp70-Proteins weisen ebenfalls die Fähigkeit auf, NK-Zellen zu aktivieren. Die Aktivierung kann vom Fachmann ohne weiteres anhand der Lehre der Erfindung überprüft werden. Insofern ist der Fachmann auch ohne weiteres in der Lage, Fragmente aus dem vorstehend genannten Fragment 384-641 gentechnologisch herzustellen (allgemeine Verfahren hierzu sind beschrieben in Sambrook et al., "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", 2. Auflage 1989, CSH Press, Cold Spring Harbor, N. Y.) und auf die gewünschten Aktivierungseigenschaften hin zu testen.

Der Begriff "Derivat" umfaßt sowohl Derivate des Hsp70-Proteins als auch Derivate des C-terminalen Fragmentes, sofern diese

Derivate die erfindungsgemäßen Funktionen aufweisen. Derartige Derivate weisen vorzugsweise dieselbe dreidimensionale Struktur wie Hsp-70 bzw. dessen C-terminale Fragmente auf und können beispielsweise durch Peptidomimetics hergestellt werden (al-Obeidi et al., Mol. Biotechnol. 9 (1998), 205-223; Wiley et al., Med. Res. Rev. 13 (1993), 327-384; Bohm, J. Comput. Aided Mol. Des. 10 (1996), 265-272; Hruby et al., Biopolymers 43 (1997), 219-266).

Der Begriff "NK-Zellen" ("Natürliche Killerzellen", engl.: "natural killer cells") umfaßt große, granuläre Lymphozyten, die CD45 auf der Oberfläche exprimieren und ohne vorherige Stimulation Killeraktivität aufweisen. Sie sind insbesondere dadurch gekennzeichnet, daß sie CD16 exprimieren und/oder durch Interleukin-2 stimulierbar sind und/oder kein CD3 exprimieren und/oder keine α/β - oder γ/δ - T-Zell-Rezeptoren besitzen.

Die NK-Zellen, die im erfindungsgemäßen Verfahren ihre Wirksamkeit entfalten, sind weiterhin bevorzugt durch die nachfolgenden Eigenschaften gekennzeichnet:

- sie sind transient plastik-adhärenz nach Zugabe von IL-2 in Mengen von 10 bis 10.000 Einheiten, z.B. von 100 l.E, wobei IL-2 von der Firma Chiron bezogen werden kann;
- die Adhärenz erfolgt 3-18 Stunden nach Zugabe des IL-2 auf frisch isolierte PBL (monozytendepletierte, periphere Blutlymphozyten);
- die NK-Zellen weisen eine CD16dim Expression auf (Mittelwert der Fluoreszenz schwach);
- die NK-Zellen exprimieren CD56 und CD57 als typische NK-Marker;
- die NK-Zellen exprimieren CD94 (C-Typ Lectin Killer-Zell-Rezeptor);
- die NK-Zellen sezernieren nach Aktivierung mit Hsp70 und Zytokinen IFN γ ;
- die NK-Zellen sind durch Zugabe von Hsp70 (gereinigtes Protein) stimulierbar (Wachstum und zytotoxische Aktivi-

tät);

- sie sind nicht vom MHC-Typ des Patienten abhängig.

Erfindungsgemäß können auch andere NK-Zellpopulationen eingesetzt werden. Voraussetzung ist jedoch, daß sie durch das erfindungsgemäß eingesetzte Hsp70 oder durch die genannten Fragmente oder Derivate aktivierbar sind. Erfindungsgemäß können isolierte NK-Zellen eingesetzt werden. Es ist aber auch möglich, Zellgemische wie periphere mononucleäre Blutzellen (PBMC) einzusetzen, in denen NK-Zellen enthalten sind.

Der Begriff "Aminosäuresequenzhomologie zum C-terminalen Bereich des Hsp70-Proteins von $\geq 70\%$ " bedeutet im Sinne dieser Erfindung, daß mindestens 70% der Aminosäuren bei einer Gegenüberstellung ("alignment") von zwei Aminosäuresequenzen identisch sind, wobei die eine der gegenübergestellten Aminosäuresequenzen die des C-terminalen Bereichs von Hsp70 ist. Umfaßt sind auch solche Sequenzen, bei denen 70% der Aminosäuren identisch sind, die sich aber zusätzlich von der C-terminalen Hsp70-Referenzsequenz bei der Gegenüberstellung durch Lücken ("gaps") unterscheiden. Diese Lücken können entweder im erfindungsgemäß eingesetzten homologen Molekül oder im Referenzmolekül auftreten. Alignments, üblicherweise durch Computervergleich, sind im Stand der Technik bekannt, desgleichen die Programme, mit denen derartige Alignments durchgeführt werden können. Es ist außerdem bevorzugt, daß die Proteine bzw. Fragmente eine Aminosäuresequenzhomologie zum carboxy-terminalen Bereich, also im Bereich der Aminosäuren 384 - 641, des Hsp70-Proteins von $\geq 80\%$ und bevorzugt $\geq 90\%$, aufweisen.

Der Befund, daß Hitzeschockproteine, C-terminale Fragmente davon oder davon abgeleitete Derivate über die Aktivierung von NK-Zellen immunologische Aktivitäten induzieren, selbst wenn sie nicht mit Peptiden komplexiert sind oder auf der Oberfläche von Zellen wie Tumorzellen präsentiert werden, muß als höchst überraschend angesehen werden. Beispielsweise ging man noch im

Juni 1998 (vgl. Srivastava et al., Immunity 8 (1998), 657-665, hier gutachtlich zitiert) davon aus, daß isolierte Hitzeschockproteine keine immunogenen Wirkungen wie CTL-Induktion aufweisen (Blachere et al., J. Exp. Med. 186 (1997), 1315-1322) und keine protektive Immunität gegenüber irgendeiner Krebsart induzieren können (Udono und Srivastava, J. Immunol. 152 (1994), 5398-5403). Mit der vorliegenden Erfindung wird hingegen möglich, patientenunabhängig eine in vitro oder in vivo Aktivierung von NK-Zellen herbeizuführen, die nach der Aktivierung erfolgreich gegen verschiedene Krankheiten, beispielsweise Tumorerkrankungen eingesetzt werden können. Die Verwendung von isoliertem Hitzeschockprotein erlaubt darüber hinaus eine bessere Standardisierung von Aktivierungsvorgängen. Mit der vorliegenden Erfindung ist es möglich, HSP in unbegrenzter Menge herzustellen, wohingegen bei der patientenspezifischen Aufbereitung der HSP-Peptid Komplexe die Menge an HSP über die Menge des Tumors limitiert ist.

Überraschend ist über die vorgenannten Befunde hinaus, daß auch der Einsatz von C-terminalen Fragmenten des Hsp70-Proteins zum erfindungsgemäßen Ergebnis führt. Unerwartet ist vor allem, daß der C-Terminus offensichtlich dieselbe dreidimensionale Struktur aufweist, die von NK-Zellen erkannt wird und zu deren Aktivierung führt. Die Möglichkeit des Einsatzes von C-terminalen Hsp70-Fragmenten in der Aktivierung von NK-Zellen birgt unter anderem den Vorteil, daß die rekombinante Herstellung zu besseren Ausbeuten im Vergleich zur rekombinanten Darstellung des gesamten Proteins führen sollte.

Die Herstellung von Derivaten von Hsp70 oder dessen C-terminalen Fragmenten, beispielsweise durch Peptidomimetics, ist beispielsweise dann sinnvoll, wenn der rasche Abbau dieser (Poly)peptide im Körper vermieden werden soll. Dies kann z. B. bei der oralen Gabe von Arzneimitteln eine Rolle spielen.

Vorzugsweise umfaßt die Aktivierung die Induktion einer durch NK-Zellen vermittelten Immunantwort. Dabei ist besonders

bevorzugt, daß die durch NK-Zellen vermittelte Immunantwort eine Stimulation der Proliferation der NK-Zellen und/oder die Steigerung der zytolytischen Aktivität der NK-Zellen umfaßt. Der Einsatz von Hsp70 bzw. von Fragmenten oder Derivaten davon erfolgt in allen vorgenannten Ausführungsformen in einer (pharmazeutisch) wirksamen Menge, so daß die gewünschte Aktivierung, vorzugsweise die Immunantwort, induziert wird. Die Immunantwort richtet sich vornehmlich, aber nicht ausschließlich gegen solche Zellen, die Hsp70 oder Fragmente davon auf der Zelloberfläche exprimieren. Hierzu gehören sowohl menschliche als auch tierische Zellen. Zu diesen Hsp70 auf der Zelloberfläche exprimierenden menschlichen oder tierischen Zellen gehören beispielsweise Tumorzellen und Zellen von Patienten mit Infektionskrankheiten. Die zytolytische Aktivität der durch Hsp70 erfindungsgemäß stimulierten NK-Zellen ist signifikant erhöht, so daß eine immunologische Elimination dieser Hsp70 auf der Zelloberfläche exprimierenden Zellen ermöglicht wird.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendung ist die zytolytische Aktivität gegenüber Tumorzellen und/oder Zellen von Patienten mit Infektionserkrankungen gesteigert.

In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendung ist die zytolytische Aktivität gegenüber Leukämiezellen, Lymphomzellen, Tumorzellen und metastasierenden Zellen solider Tumore und Zellen von Patienten mit viralen, mykotischen oder bakteriellen Infektionserkrankungen gesteigert. Ein Beispiel für die Behandlung viraler Erkrankungen ist die Behandlung von HIV-Infektionen, ein Beispiel für eine bakterielle Infektion ist die Behandlung von durch Mykobakterien hervorgerufenen Erkrankungen. Zu den soliden Tumoren, deren Metastasenzellen durch das erfindungsgemäße immunologische Verfahren behandelbar sind, gehören beispielsweise Karzinome, Sarkome, Melanome oder Leukämien und Lymphome. Beispiele für Karzinome sind Kolonkarzinome und Lungenkarzinome.

Durch die erfindungsgemäße Verwendung eines Hsp70-Proteins, Teilen dieses Proteins oder $\geq 70\%$ sequenzhomologer Proteine können Zellen lysiert werden, die durch Viren, Bakterien und/oder Pilze infiziert sind oder Zellen, die tumorigen verändert sind. Auch Zellen, die antigene Teile dieser Fremdorganismen oder Teile von Tumorzellen enthalten, können durch die erfindungsgemäße Anwendung des Hsp70-Proteins mit Hilfe der aktivierten NK-Zellen lysiert werden.

Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur ex vivo oder in vitro Aktivierung von NK-Zellen, wobei man eine NK-Zellen enthaltende physiologische Zellsuspension mit einem Hsp70-Protein, einem C-terminalen Fragment davon oder einem Derivat davon oder einem Protein mit einer Aminosäuresequenzhomologie zum C-terminalen Bereich (Aminosäuren 384-641) des Hsp70-Proteins von $\geq 70\%$ vermischt und inkubiert, um eine Aktivierung der NK-Zellen zu bewirken.

Die Inkubation kann bei Raumtemperatur, bevorzugt aber bei physiologischer Temperatur (37°C) auf einem Schüttler (sanftes Schütteln) erfolgen.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens umfaßt die Aktivierung eine Stimulation der Proliferation der NK-Zellen und/oder eine Steigerung ihrer Zytotoxizität. Hinsichtlich der bevorzugten Zielzellen für die zytotoxische Aktivität wird auf die vorstehenden Darstellungen verwiesen.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden als NK-Zellen enthaltende physiologische Zellsuspension periphere, mononukleäre Blutzellen (PBMC) oder eine NK-Zellen enthaltende Fraktion hiervon eingesetzt.

Die NK-Zellen können durch geeignete Verfahren aus den zu behandelnden Patienten oder aus einem gesunden Spender durch

Blutabnahme gewonnen werden. Bevorzugt sollen Buffy-Coats (Lymphozytenkonzentrate), die NK-Zellen enthalten, verwendet werden.

Buffy-Coats (Lymphozytenkonzentrate) werden über die Vene aus dem Patienten entnommen und z.B. mit Heparin versetzt, um eine Verklumpung der Zellen zu verhindern. Die mit Heparin versetzten Buffy-Coats werden in einem sterilem Gefäß (zumeist Plastiksäckchen) gesammelt und anschließend zentrifugiert, so daß es zu einer Anreicherung von Blutzellen (= PBMC, periphere, mononukleäre Blutzellen, z.B. Lymphozyten, Erythrozyten, Granulozyten usw.) kommt. Das Lymphozytenkonzentrat bleibt steril im Gefäß (Plastikbeutel). Im Falle von gesunden Probanden besteht ein Buffy-Coat aus weißen und roten Blutzellen (Lymphozyten, Erythrozyten usw.). Im Falle eines Tumorpatienten besteht der Buffy-Coat nicht nur aus Blutzellen, sondern kann auch Tumorzellen enthalten (bei Leukämien, z.B. leukämische Zellen = Blasten; bei soliden Tumoren, z.B. metastastasierte Zellen).

Die Buffy-Coats, die periphere, mononukleäre Blutzellen enthalten, werden in Form einer physiologischen Zellsuspension, bevorzugt versetzt mit Heparin, eingesetzt. Das Heparin verhindert eine Aggregation der Zellen.

In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens enthält die Zellsuspension weiterhin Hsp70 auf der Zelloberfläche exprimierende menschliche oder tierische Zellen. Eine Stimulation der NK-Zellen durch Hsp70-Protein kann allerdings auch erfolgen, wenn keine Hsp70 auf der Zelloberfläche exprimierende Zielzellen (Tumorzellen, infizierte Zellen) vorhanden sind.

In einer anderen besonders bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens werden als menschliche oder tierische Zellen Tumorzellen, Zellen von Patienten mit Infektionserkrankungen eingesetzt.

In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens werden als menschliche oder tierische Zellen Leukämiezellen, Lymphomzellen, metastasierende Zellen solider Tumore und Zellen von Patienten mit viralen, mykotischen oder bakteriellen Infektionserkrankungen eingesetzt.

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens wird die die Zellen und Proteine enthaltende physiologische Zellsuspension mindestens 3 Stunden inkubiert.

Um die zytolytische Wirkung der Natürlichen Killerzellen zu steigern, werden in dieser Ausführungsform vorzugsweise die Zielzellen der Natürlichen Killerzellen zusammen mit den Natürlichen Killerzellen und dem Hsp70 miteinander in Suspension vorzugsweise für den genannten Zeitraum inkubiert. Allerdings sind auch Langzeitinkubationen für mindestens 4 Tage möglich. Dementsprechend wird in einer anderen besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens die Inkubation 4 Tage lang vorgenommen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendung oder des erfindungsgemäßen Verfahrens wird zusätzlich ein Zytokin eingesetzt. Das Zytokin kann dabei getrennt mit den NK-Zellen und/oder den Hitzeschockproteinen, Fragmenten oder Derivaten davon oder zusammen in einer Dosis eingesetzt werden.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Verwendung oder des Verfahrens wird als Zytokin ein Interleukin eingesetzt. Auch eine Kombination von Interleukinen kann erfindungsgemäß zusammen mit dem Hsp70-Protein eingesetzt werden, um die Aktivierung der NK-Zellen weiter zu verstärken, z.B. die durch NK-Zellen vermittelte Immunantwort oder die Stimulation der Proliferation der NK-Zellen.

In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform der Verwendung oder des Verfahrens der Erfindung wird als

Interleukin IL-2, IL-12 und/oder IL-15 eingesetzt.

Durch die Erfindung eröffnet sich die Möglichkeit, nicht nur ex vivo aktivierte NK-Zellen in den Patienten zu reinfundieren, sondern aufgrund der Vermeidung toxischer Stoffe erfindungsgemäß behandelte NK-Zellen, z.B. auch in Kombination mit einer Hyperthermiebehandlung, auch in vivo einzusetzen. Diese Ausführungsform der Erfindung hat den weiteren, unschätzbaren und überraschenden Vorteil, daß auch Zielzellen, z.B. Tumorzellen, die den bekannten Therapieverfahren widerstanden, nunmehr durch zytolytische Wirkung von NK-Zellen immunologisch abgetötet werden können. Die Erfindung betrifft somit ferner ein Verfahren zur in vivo-Aktivierung des Immunsystems, wobei man einem Patienten eine pharmazeutisch wirksame Menge von nach dem vorstehend beschriebenen Verfahren aktivierten NK-Zellen verabreicht, gegebenenfalls in Kombination mit oder zeitlich vor einer pharmazeutisch wirksamen Menge eines Hsp70-Proteins, eines C-terminalen Fragmentes davon oder eines Derivats davon oder eines Proteins mit einer Aminosäuresequenzhomologie zum C-terminalen Bereich (Aminosäuren 384-641) des Hsp70-Proteins von $\geq 70\%$ verabreicht.

Im Falle, daß die Wirkstoffe zusammen verabreicht werden, können die Wirkstoffe in einem Container oder mehreren Containern getrennt formuliert sein, während sie im Falle einer zeitlich getrennten Verarbeitung getrennt formuliert sind.

Sofern die NK-Zellen vor dem Hsp70-Proteinen verabreicht werden, sollte der entsprechende Zeitraum vor der Gabe des Hsp70-Proteins mindestens 3-24 Stunden betragen.

Ein Beispiel für eine erfindungsgemäße Behandlung ist wie folgt:

Buffy-coat-Zellen (Lymphozytenkonzentrate), bestehend aus peripheren, mononukleären Blutzellen oder Knochenmarkszellen und Tumorzellen aus Tumorpatienten, beispielsweise Leukämiepatienten, werden in einem Behälter, beispielsweise einem Kunststoff-

behälter, der steril verschlossen ist, einer Behandlung mit dem Hsp70, Hsp70-verwandten Protein und/oder wirksamen Fragmenten oder Derivaten hiervon, in einem temperaturkontrollierten Wasserbad einer Hitzebehandlung unterzogen. Im Behälter befinden sich sowohl die Tumorzellen als auch die NK-Zellen, die über die vorliegende Behandlung stimuliert werden. Nach Abschluß des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die aktivierte NK-Zellen und die lysierten Tumorzellen enthaltende Kulturlösung in den Patienten reinfundiert.

Erfindungsgemäß liegen die NK-Zellen gegebenenfalls zusammen mit anderen peripheren, mononukleären Blutzellen, beispielsweise zusammen mit Erythrozyten und Granulozyten und T-Zellen, vor. Bevorzugt werden somit die NK-Zellen nicht alleine verwendet, sondern durch Isolierung von Buffy-Coat-Zellen eine Mischung der peripheren, mononukleären Blutzellen gewonnen. Bei Tumorkranken enthalten diese Anreicherungen weiterhin Tumorzellen, die durch das erfindungsgemäße Verfahren immunologisch eliminiert werden.

Desweiteren betrifft die Erfindung ein Verfahren zur in vivo-Aktivierung von NK-Zellen, wobei man einem Patienten eine pharmazeutisch wirksame Menge eines Hsp70-Proteins, eines C-terminalen Fragmentes davon oder eines Derivats davon oder eines Proteins mit einer Aminosäuresequenzhomologie zum C-terminalen Bereich (Aminosäuren 384-641) des Hsp70-Proteins von $\geq 70\%$ verabreicht.

Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Behandlung von Tumoren, Krebserkrankungen und/oder Infektionskrankheiten, wobei man einem Patienten eine pharmazeutisch wirksame Menge von nach dem vorstehend beschriebenen, erfindungsgemäßen Verfahren aktivierten NK-Zellen und/oder eines Hsp70-Proteins, eines C-terminalen Fragmentes davon oder eines Derivats davon oder eines Proteins mit einer Aminosäuresequenzhomologie zum C-terminalen Bereich (Aminosäuren 384-641) des Hsp70-Proteins von $\geq 70\%$ verabreicht.

In einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens der Erfindung ist der Tumor ein solider Tumor oder eine Metastase. Die Behandlungsstrategie zielt insbesondere auf die Elimination von Einzelzell-Metastasen ab, die durch das erfindungsgemäße Verfahren immunologisch eliminiert werden können. Eine verstärkte Aktivierung Hsp70-spezifischer NK-Zellen kann durch eine Zugabe von Interleukin-2 in einer niedrigen Dosis, beispielsweise 100 I.U., erreicht werden. Das Interleukin-2 kann beispielsweise zusammen mit dem Hsp70 in den sterilen Behälter, beispielsweise einen Kunststoffbehälter, eingeführt werden.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist die Krebserkrankung Leukämie oder ein Lymphom.

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist die Infektionskrankheit viralen, mykotischen oder bakteriellen Ursprungs.

Die Erfindung betrifft ferner ein Arzneimittel, einen medizinischen Hilfsstoff, oder ein Medizinprodukt, das ein Hsp70-Protein, ein C-terminales Fragment davon oder ein Derivat davon oder ein Protein mit einer Aminosäuresequenzhomologie zum C-terminalen Bereich (Aminosäuren 384-641) des Hsp70-Proteins von $\geq 70\%$ und/oder von nach dem erfindungsgemäßen Verfahren aktivierten NK-Zellen in einer therapeutisch wirksamen Menge sowie gegebenenfalls übliche Träger- und/oder Hilfsstoffe enthält. Dem Arzneimittel ist gegebenenfalls ferner ein wie oben definiertes Zytokin zugesetzt.

In einer bevorzugten Ausführungsform des Arzneimittels, medizinischen Hilfsstoffs oder Medizinproduktes liegt das Protein in einer Konzentration von mindestens 1 $\mu\text{g/ml}$, bevorzugt bis zu 1000 $\mu\text{g/ml}$, vorzugsweise 1×10^6 bis 5×10^8 NK-Zellen, wobei eine Menge von 10 μg bis 600 $\mu\text{g/ml}$ bevorzugt ist.

Beispiele für geeignete pharmazeutisch verträgliche Träger sind

dem Fachmann geläufig und umfassen beispielsweise phosphatgepufferte Salzlösungen, Wasser, Emulsionen, wie z. B. Öl/Wasser-Emulsionen, sterile Lösungen, etc. Die pharmazeutischen Zusammensetzungen (Arzneimittel), die derartige Träger enthalten, können nach gängigen Verfahren formuliert werden. Die pharmazeutischen Zusammensetzungen können dem betroffenen Individuum in einer geeigneten Dosis verabreicht werden. Arten der Verabreichung sind beispielsweise intravenös, intraperitoneal, subcutan, intramuskulär, topisch oder intradermal. Die Dosierung hängt dabei von vielen Faktoren ab, z. B. von der Größe, dem Geschlecht, dem Gewicht, dem Alter des Patienten, sowie der Art der speziell verabreichten Verbindung, der Art der Administration etc. Im allgemeinen liegt die monatlich verabreichte Dosis bei 10 bis 1000 µg. Im Zusammenhang mit der intravenösen Injektion von erfindungsgemäßen Substanzen sind Dosierungen von 10 bis 1000 µg gängig. Die Zusammensetzungen können lokal oder systemisch verabreicht werden. Im allgemeinen wird die Verabreichung parenteral erfolgen. So werden die erfindungsgemäß mit Hsp70-Protein behandelten NK-Zellen bevorzugt intravenös injiziert. Es kann auch eine Injektion direkt in den Tumor erfolgen, wobei eine wirksame Menge der NK-Zellen injiziert wird. Selbstverständlich sind auch andere, an sich bekannte Applikationsformen möglich.

Das Hsp70-Protein selbst kann beispielsweise zusammen mit Zytokinen appliziert werden. Ein Beispiel für eine Applikation ist die Injektion des Hsp70-Proteins, z.B. zusammen mit Zytokinen intravenös, intramuskulös, subkutan, intraperitoneal oder auch in die Fußsohle.

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform der Verwendung oder des Verfahrens oder des Arzneimittels, des Medizinprodukts oder des medizinischen Hilfsmittels der Erfindung ist das Hsp70-Protein ein humanes Protein. Beispielsweise ist das erfindungsgemäße Protein humanen Ursprungs (bei der Isolierung aus Zellextrakten) bzw. weist die Aminosäuresequenz des

menschlichen Hsp70-Proteins auf (z. B. nach rekombinanter Herstellung). Es können aber auch tierische Hsp70-Proteine eingesetzt werden.

Das erfindungsgemäß eingesetzte Hsp70-Protein oder die Fragmente können sowohl rekombinant hergestellt werden, aus Zellextrakten isoliert werden oder über chemische Synthese hergestellt werden.

Bevorzugt ist, daß das Hsp70-Protein oder dessen Fragment oder Derivat ein rekombinantes Protein ist. Derartige rekombinante Proteine können nach Standardverfahren hergestellt werden.

Diese Standardverfahren sind dem Fachmann bekannt (Sambrook et al., loc. cit. und Ausubel, "Current Protocols in Molecular Biology", Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989)). Zur rekombinanten Herstellung der Proteine werden Nucleinsäuremoleküle eingesetzt, die das erfindungsgemäße Hsp70-Protein oder Fragmente hiervon codieren. Diese können verschiedene Nucleinsäuremoleküle sein, insbesondere DNA oder RNA Moleküle, beispielsweise cDNA, genomische DNA, mRNA etc. Diese Nucleinsäuremoleküle können natürlich vorkommenden Moleküle sein und/oder durch genetische oder chemische Syntheseverfahren hergestellte Moleküle. Um rekombinante Proteine herzustellen, verwendet der Fachmann Vektoren, insbesondere Plasmide, Cosmide, Viren, Bakteriophagen und andere in der Gentechnik gängige Vektoren (Sambrook et al., loc. cit.). Die in den Vektoren enthaltenen Nucleinsäuremoleküle können verknüpft sein mit regulatorischen Elementen, die die Expression in prokaryontischen oder eukaryontischen Zellen gewährleistet. Hierbei kann der Begriff "Expression" Transkription als auch Transkription und Translation bedeuten. Regulatorische Elemente umfassen dabei insbesondere Promotoren. Für die Expression eines Nucleinsäuremoleküls in prokaryontischen Zellen stehen eine Reihe von Promotoren zur Verfügung, z. B. der E. coli lac- oder trp-Promotor, der P_R- oder P_L-Promotor des Lambda-Phagen, lacI, lacZ, T3, T7, gpt, etc. Eukaryontische Promotoren sind

beispielsweise der CMV immediate early-Promotor, der HSV-Promotor, der Thymidinkinase-Promotor, der SV40-Promotor, LTRs von Retroviren und der Maus Metallothionin I-Promotor. Es ist bereits eine Vielzahl von Expressionvektoren für die Expression in prokaryontischen oder eukaryontischen Zellen beschrieben, z. B. für Eukaryonten pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden) oder GEM1 (Promega Biotec, Madison, WI, USA), pSV2CAT, pOG44 und für Prokaryonten pQE70, pQE60, pBluescript SK, etc. Neben Promotoren können diese Vektoren auch Elemente zur weiteren Steigerung der Transkription enthalten, wie z. B. sogenannte Transkriptions-Enhancer. Beispiele dafür sind der SV40-Enhancer, der Polyoma-Enhancer, der Cytomegalovirus early promoter-Enhancer und Adenovirus-Enhancer. Die rekombinanten Proteine können daher in verschiedenen prokaryontischen oder eukaryontischen Wirtszellen, beispielsweise unter Einsatz der oben beschriebenen Vektoren, exprimiert werden. Beispiele für solche Wirtszellen sind bakterielle Zellen (wie z. B. E. coli, Streptomyces, Bacillus, Salmonella typhimurium), Pilzzellen (wie beispielsweise Hefezellen, insbesondere Saccharomyces cerevisiae), Insektenzellen (wie z. B. Drosophila- oder SF9-Zellen), tierische Zellen (wie z. B. CHO oder COS-Zellen) oder auch Pflanzenzellen, etc. Solche Wirtszellen werden unter Bedingungen kultiviert, die die Expression des rekombinanten Proteins erlauben, welches anschließend aus den Zellen und/oder aus dem Kulturmedium gewonnen werden kann. Verfahren zur Expression von Fremdprotein in verschiedenen Arten von Wirtszellen sowie zur Gewinnung des produzierten Proteins sind dem Fachmann geläufig.

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform der Verwendung oder des Verfahrens oder des Arzneimittels, Medizinprodukts oder medizinischen Hilfsstoffs der Erfindung umfaßt das Hsp70-Protein das C-terminale Fragment die Aminosäuren 384 bis 561 von menschlichem Hsp70 oder den entsprechenden Bereich aus einem anderem Hsp70, das die erfindungsgemäßen Wirkungen aufweist oder umfaßt das C-terminale Fragment die Aminosäuren 454 bis 460 von menschlichem Hsp70. Erfindungsgemäß konnte

überraschenderweise gezeigt werden, daß Fragmente, welche diese minimale Sequenz von 7 Aminosäuren (NLLGRFE) haben, durch Antikörper gehemmt werden, wodurch NK-Aktivierung unterbunden bzw. getrennt wurde. Die Experimente wurden entsprechend Multhoff et al., J. Immunol. 158 (1997), 4341-4350 durchgeführt. Es wurde der von Amersham erhältliche Antikörper RPN 1197 eingesetzt. Die 7 Aminosäuren können dabei von natürlicherweise flankierenden Hsp70-Sequenzen oder durch andere Aminosäuren flankiert sein. Bevorzugt ist, daß die 7 Aminosäuren in ihrem natürlichen Kontext verbleiben. Sofern andere flankierende Aminosäuren eingesetzt werden, wird bevorzugt der dreidimensionale Kontext, in dem die genannten 7 Aminosäuren natürlicherweise stehen beibehalten. Innerhalb der 7 Aminosäuren können weitere Aminosäureaustausche erfolgen, sofern die Homologie von mindestens 70% beibehalten wird. Allerdings umfassen diese Austausche nicht einen Austausch von Arginin in Position 458 durch Lysin. Dieser Austausch führt zu einer Konformationsänderung. Entsprechend sind Austausche, die in den Bereich der 7 Aminosäuren zu einer Konformationsänderung führen nur dann von der Erfindung umfaßt, wenn sie die gewünschten Aktivierungseigenschaften aufweisen.

Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung der nach einem Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ausführungsformen behandelten NK-Zellen zur Therapie von Tumorerkrankungen, und/oder Infektionserkrankungen.

In einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendung erfolgt die Therapie durch Reinfundierung der behandelten NK-Zellen.

Die vorstehend beschriebenen in vivo Verfahren können auch als Behandlungsverfahren zur Behandlung der beschriebenen Indikatoren eingesetzt werden.

Die Figuren zeigen:

FIGUR 1: Vergleich der proliferierenden Aktivität getrennter NK-(A)- und T(B)-Zellen, die entweder mit IL-2 (100 IU/ml)-Medium oder mit anderen rekombinanten Hsp70-Proteinen (rHsp70, rHsp70-C_{term.} (Aminosäuren 384-561), rHsp70homC, DnaK, Hsc70 und hitzedenaturiertem rHsp70), die in IL-2-Medium (100 IU/ml) suspendiert sind, je mit einer Konzentration von 10 µg/ml, stimuliert wurden. Die phänotypische Charakterisierung der NK-Zellen ist wie folgt:

CD3 : < 5%; CD16/CD56 : 46-87%; CD94 : 60-70%; p58.1 und p58.2 : < 5% und T-Zellen: CD3 : 85-92%; CD16/CD56 : 5-10%; CD94 : < 29%; p58.1 und p58.2: nicht getestet; p70: nicht getestet, durchflußzytometrisch bestimmt. Die Proliferation der Zellen wurde nach 48 Stunden und nach Inkubation mit ³H-Thymidin (1 µCi/ml) bei 37°C für 18 Stunden bestimmt. Der relative Prozentsatz der ³H-Thymidin-Aufnahme in NK-(A) und T(B)-Zellen wurde mit den Wirkungen von IL-2 allein (100%) verglichen. Die Werte zeigen die Mittelwerte von vier bis sieben unabhängigen Experimenten ± Standardabweichung.

FIGUR 2: Vergleich der zytotoxischen Aktivität hochgereinigter NK-Zellen (CD3 : < 2%; CD16/CD56 : 75-80%; CD94 : 65-87%; p58.1 und p58.2 : 20-30%; p70 : < 10%), die entweder unbehandelt blieben (durchgezogene Linien, leere Symbole) oder nach einer Vorinkubation der NK-Zellen mit rHsp70 (A)-Protein (je 5 µg/ml für 4 Tage; durchgezogene Linien, ausgefüllte Symbole) vorinkubiert wurden, gegenüber ⁵¹Cr-markierten Tumortargetzellen CX+ (A) und CX- (B), die sich aufgrund ihrer Fähigkeit, Hsp70 auf ihrer Plasmamembran zu exprimieren, unterscheiden. Die Ergebnisse sind als Prozentsatz der spezifischen Lyse bei verschiedenen E

: T-Verhältnissen von 0,2 : 1 bis 2 : 1 ausgedrückt. Jeder Punkt stellt den Mittelwert zumindest dreier unabhängiger Experimente \pm Standardabweichung dar. Der Prozentsatz an spontaner Freisetzung für jede Tumortargetzelllinie war immer unter 15%.

FIGUR 3: Tumorwachstum von Hsp70 tragenden CX+ Zellen in immundefizienten Mäusen. Nach i. p. -Injektion von NK-Zellen wird das Tumorwachstum vollständig inhibiert (bei i.p.-Injektion der Tumorzellen). Die Tumorgroße wurde in cm² angegeben.
Tumorwachstum nach i.p.-Injektion von CX+ und NK-Zellen am Tag 21.

FIGUR 4: Tumorwachstum von Hsp70 tragenden CX+ Zellen in immundefizienten Mäusen. Nach i. v.-Injektion von NK-Zellen wird das Tumorwachstum vollständig inhibiert. Das Tumorwachstum wurde in Gramm gemessen.
Tumorwachstum nach o.t.-Injektion von CX+ und i.v.-Injektion von NK-Zellen am Tag 35. Die NK-Zellen verhindern das Tumorwachstum von Hsp70-tragenden CX+ Zellen nach 3 bzw. 5 Wochen nach Injektion und (vgl. Figur 3). Sowohl eine intraperitoneale als auch eine intravenöse Applikation der NK-Zellen führt zu vergleichbaren Ergebnissen.

FIGUR 5: Intaktes Hsp70-Protein mit Darstellung des C-terminalen Bereichs

FIGUR 6: Darstellung des Einflusses von Hsp70 und/oder Zytokinen auf die durch NK-Zellen vermittelte Immunantwort. Die Zytokinzugabe bewirkt auch eine Stimulation von T-Zellen.

Jedes der hierin zitierten Dokumente (einschließlich Angaben des Herstellers, Bedienungsanleitungen, etc.) wird hiermit

durch Bezugnahme in die Beschreibung inkorporiert.

Die Beispiele erläutern die Erfindung.

Beispiel 1: Gesteigerte Proliferation von NK-Zellen nach Gabe von Hsp70

Die Proliferation gereinigter NK- und T-Zellen, die mit den Hsp70-Proteinen rHsp70, DnaK, Hsc70, rHsp70-C term. und rHsp70homC (Aminosäuren 384-561) stimuliert worden waren, wurde in einem ^3H -Thymidin-Aufnahme-Standardtest bestimmt (Testbedingungen vgl. später). Dazu wurden zunächst periphere Blutlymphozyten aus freiwilligen, menschlichen Spendern in nicht-adhärenente CD3+ T-Zell und transient (12-24 Stunden) adhärenente CD3-(CD16+/CD56+) NK-Zell-Subpopulationen in einem Mehrschrittverfahren und nachfolgender 12-stündiger Inkubation in einem IL-2-enthaltendem Medium (vgl. 3) getrennt. Die Zellen wurden getrennt in rIL-2 (100 IU, Chiron, Frankfurt, Deutschland), enthaltend ein RPMI 1640 (Life Technologies, Eggenstein, Deutschland)-Medium für 3-4 Tage lang kultiviert. Die Proliferation wurde als H-3 Aufnahme gemessen.

Panning-Experimente wurden unter Verwendung von humanem, rekombinanten Hsp70 (rHsp70, SPP-755, StressGen Biotechnologies, Victoria, Canada) und DnaK (Hsp70-Homolog, erhalten aus E. coli, SPP-630, StressGen) durchgeführt. Die Proteine wurden in PBS zu einer Stammkonzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ verdünnt und in Aliquots bei -80°C tiefgefroren. T-25-Kulturflaschen wurden mit rHsp70 bzw. DnaK-Protein (10 $\mu\text{g/ml}$), verdünnt in 3 ml eiskaltem Carbonatpuffer, pH 9,5 12 Stunden lang inkubiert. Nach Abblockung nicht-spezifischer Bindungsstellen mit PBS/5% FKS wurde eine Mischung aus T- und NK-Zellen suspendiert in PBS/1% FKS in einem Verhältnis von 1 : 2 und 2 : 1 in den Kulturflaschen 1 Stunde lang bei Raumtemperatur inkubiert. Nicht-adhärenente Zellen wurden aus der Überstandsfraktion nach Inkubation erhalten. Adhärenente Zellen wurden durch sequentielle Waschschriffe unter Verwendung von

eiskalter PBS/10% FKS-Lösung erhalten. Um leicht-adhärenzte Zellen zu entfernen, wurde ein einzelner, milder Waschschrift verwendet, während stark-adhärenzte Zellen durch zusätzliche, stringente Waschschriffe erhalten wurden. Die bei jedem Schritt erhaltenen Zellpopulationen wurden getrennt gezählt und durchflußzytometrisch, phänotypisch charakterisiert.

Die Durchflußzytometrie wurde wie in (4) beschrieben auf einem FACScan-Instrument (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Der Prozentsatz an positiv-gefärbten Zellen wurde definiert als Differenz zwischen der Zahl spezifisch-gefärbter, vitaler (propidiumiodid-negativer) Zellen minus der Anzahl an Zellen, die mit dem Isotyp entsprechenden Kontrollantikörpern gefärbt waren. Die nachfolgenden Antikörper wurden zur phänotypischen Kennzeichnung der Effektorzellen verwendet:

Dem Isotyp-entsprechender Kontrollantikörper (Dianova, Hamburg, Deutschland; Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland), CD16 (Dianova, Hamburg, Deutschland), CD3 (Dianova, Hamburg, Deutschland).

Die Proliferationsfähigkeit von T- oder NK-Zellen gegen unterschiedliche Hsp70-Proteine wurde in einem ³H-Thymidin-Aufnahme-Standardtest bestimmt. Lebensfähige Zellen (5×10^4 Zellen/100 µl) wurden in eine 96 Vertiefungen-enthaltende Mikrotiterplatte mit einem flachen Boden (Greiner, Nürtingen, Deutschland) eingesetzt, wobei ein supplementiertes RPMI 1640-Medium mit 100 IU IL-2 und verschiedenen, rekombinanten Hsp70-Proteinen (rHsp70, DnaK, Hsc70, die konstitutive Form von Hsp70, gereinigt aus Rinderhirn, SPP-750; StressGen; rHsp70-C term., sie rek.

C-terminale Peptidbindungsdomäne von Hsp70 (Aminosäuren 384 - 561), rHsp70homC, die rekombinante C-terminale Peptidbindungsdomäne von Hsp70hom (Hsp70hom ist ein Testis spezifisches Mitglied der Hsp70 Familie, das eine starke Homologie (94%) zu Hsp70 aufweist), Aminosäuren 384-561) eingesetzt wurde. Durch Test verschiedener Konzentrationen der Hsp70-Proteine (1 - 200 µg/ml) konnte herausgefunden werden, daß eine Endkonzentration von 100 µg/ml zur Stimulation optimal

war. Als weitere interne Kontrolle wurde die proliferierende Aktivität gegen IL-2 (100 IU) parallel bestimmt. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden oder 48 Stunden wurden die Zellen mit ^3H -Thymidin (1 $\mu\text{Ci/Vertiefung}$) markiert, und die Gesamtaufnahme wurde nach 18-stündiger Inkubation bei 37°C in einem Flüssigszintillationszählgerät (Beckmann Instruments, München, Deutschland) bestimmt. Als interne Kontrolle wurde weiterhin die Proliferationskapazität von aus dem gleichen Spender stammenden T-Lymphozyten bestimmt. Dosisesskalierungsuntersuchungen unter Verwendung verschiedener Hsp70-Proteine/Fragmente in Konzentrationen von 1-200 $\mu\text{g/ml}$ zeigten, daß eine maximale Stimulierung der Proliferationskapazität mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Hsp70-Protein erreichbar war. Die Proliferationsaktivität isolierter NK- und T-Zellen wurde nach in vitro-Stimulation mit rHsp70, DnaK, Hsc70, rHsp70-C term. bzw. rHsp70homC (Aminosäuren 384-562) getestet. Wie in der Figur 1A gezeigt, wurde die NK-Zellproliferation durch rHsp70 signifikant stimuliert. Die Stimulation durch den carboxy-terminalen Bereich von Hsp und durch rHsp70homC, das in der C-terminalen Domäne mit den Aminosäuren 384-561 zu 94% mit Hsp70 identisch ist, ist ebenfalls möglich. Im Gegensatz dazu stimulierten DnaK und Hsc70 die Proliferation von NK-Zellen nicht. Hitzedenaturiertes rHsp70 verlor die stimulatorischen Eigenschaften für die Proliferation von NK-Zellen vollständig.

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die Proliferation von CD3-positiven T-Lymphozyten durch DnaK stimulierbar war, während rHsp70, Hsc70 und rHsp70homC und hitzedenaturiertes rHsp70 keine Wirkung auf die Proliferationsfähigkeit von T-Zellen zeigten (Figur 1B).

Zusammenfassend konnte somit eine Proliferation von NK-Zellen durch rekombinantes humanes Hsp70-Protein durch den C-terminalen Bereich von Hsp70 (384 - 561) und rHsp70homC, einem zum Hsp70 homologen Protein, induziert werden, während eine Proliferation der T-Zellen selektiv durch bakterielles Hsp70 (E. coli DnaK) stimulierbar war.

Beispiel 2: Steigerung der zytolytischen Aktivität von NK-Zellen nach Gabe von Hsp70

Eine funktionelle Analyse der NK-Zellen unter Verwendung von Hsp70-exprimierenden (CX+) und Hsp70-nicht-exprimierenden (CX-)-Tumorzellen zeigte, daß die Plasmamembranexpression von Hsp70 mit einer erhöhten Sensitivität für die durch NK-Zellen vermittelte Lysis korrelierte. Diese durch NK-Zellen vermittelte Lysis von Tumorzellen kann durch Vorinkubation der Tumorzelllinien mit monoklonalen Antikörpern, die gegen den carboxy-terminalen Bereich (Aminosäuren 504-617) von Hsp70 gerichtet sind und mit dem Antikörper RPN1197 (1, 4), blockiert werden. Nachfolgend wurde der Einfluß von rekombinantem Hsp70-Protein (rHsp70) auf die zytolytische Aktivität von NK-Zellen für die autologen, Hsp70-exprimierenden (CX+)- und Hsp70-nicht-exprimierenden (CX-)-Tumorzellen analysiert. Die Ergebnisse der Zytotoxizitätstests unter Verwendung hochgereinigter NK-Zellen, die mit Hsp70-Protein in einer Konzentration von 5 µg/ml für 4 Tage vorinkubiert worden waren, sind in der Figur 2A und B zusammengefaßt. Die Versuchsansordnung war dabei wie folgt: Zur Stimulation der zytotoxischen Aktivität wurden NK-Zellen mit 10 µg/ml rHsp70 inkubiert. Die Stimulation wurde in 4-tägigem Abstand wiederholt.

Die humanen, autologen Kolonkarzinom-Subzelllinien CX+ und CX-, die sich in ihrer Hsp70-Expression auf der Plasmamembran unterscheiden (Multhoff et al., J. Immunol. 158 (1997), 4341), wurden in RPMI 1640-Medium, supplementiert mit 10% FKS (Life Technologies), 6 mM L-Glutamin und Antibiotika (100 IU/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin; Life Technologies) kultiviert. Exponentiell wachsende Tumorzellen wurden als Targetzellen verwendet, und gereinigte CD3- NK-Zellen wurden, nach Zellsortierung unter Verwendung von eines FACStar^{plus}-Instruments (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland), als Effektorzellen eingesetzt. Die durch NK-Zellen vermittelte Zytotoxizität wurde unter Verwendung eines 4-stündigen ⁵¹Cr-Ra-

radioisotopentests (Multhoff et al., J. Immunol. 158 (1997), 4341) bestimmt. Der Prozentsatz der spezifischen Lyse wurde wie folgt berechnet: $[(\text{experimentelle Freisetzung} - \text{spontane Freisetzung}) / (\text{maximale Freisetzung} - \text{spontane Freisetzung})] \times 100$. Die spontane Freisetzung von Cr-51 betrug in allen Versuchen unter 15%.

Überraschenderweise konnte gezeigt werden, daß bei einer Inkubation der NK-Zellen mit rHsp70-Protein für mindestens 4 Tage sowohl die Proliferation als auch die zytolytische Aktivität von NK-Zellen gegenüber Hsp70-exprimierenden Tumorzellen (CX+) stimuliert wurde. Im Gegensatz dazu verloren NK-Zellen aus dem gleichen Spender, die nicht mit rHsp70 behandelt wurden, diese Reaktivität nach 10 Tagen (Daten nicht gezeigt). Die lytische Aktivität von nicht mit rHsp70 stimulierten NK-Zellen war im Vergleich zu mit rHsp70 behandelten und stimulierten NK-Zellen geringer, und es konnte dann kein signifikanter Unterschied in der Lyse Hsp70-exprimierender und nicht-exprimierender Tumorzellen festgestellt werden.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, daß der carboxy-terminale Teil von Hsp70 (Aminosäuren 384 - 641), für die Stimulierung der zytolytischen und proliferativen Funktion von NK-Zellen verantwortlich ist. Erfindungsgemäß konnte somit gezeigt werden, daß insbesondere der carboxy-terminale Teil des Hsp70-Proteins als stimulierendes Signal für NK-Zellen wirkt, die spezifisch Hsp70-exprimierende Tumorzellen in vitro angreifen.

Beispiel 3: Anti-tumorale Wirkung mit Hsp70 stimulierter NK-Zellen

Für die Untersuchung der in vivo Relevanz von NK-Zellen gegenüber Hsp70-exprimierenden Tumorzellen wurden Untersuchungen an immundefizienten SCID/beige Mäusen durchgeführt. Dabei wurden zunächst unterschiedliche Mengen an Tumorzellen (CX+ oder CX-Zellen) in SCID/beige Mäuse injiziert. Eine Menge von 2,5 Mio

Zellen erwies sich als optimale Tumorzellmenge zur Induktion von Tumorwachstum innerhalb eines Zeitraums von 3 bis 5 Wochen. Als Injektionsmethode wurde eine i.p. (intraperitoneale) oder o.t. (orthotope, d. h. hier in die Darmwand) Injektion von Kolonkarzinomzellen CX+ oder CX- in die Darmwand gewählt. Die NK-Zellen wurden nach Stimulation entweder i.p. oder i.v. (intravenös) appliziert. Wie in Figur 3 dargestellt, konnte in allen Tieren ein Tumorwachstum sowohl nach i.p. als auch nach o.t. Injektion erzielt werden. Im Gegensatz zur i.p. Injektion konnte nach o.t. Injektion neben dem Wachstum eines Primärtumors auch eine Metastasierung der CX+ Zellen vor allem in Milz und Lunge beobachtet werden (3 von 3 Mäusen nach o.t. Injektion).

Eine Injektion von humanen NK-Zellen (i.p., aber auch i.v.) selbst vier Tage nach der Injektion von Tumorzellen führt zu einer vollständigen Inhibition des Tumorwachstums. Interessanterweise konnte durch NK-Zellen nicht nur das Wachstum von Primärtumoren (im i.p. Raum oder am Darm) inhibiert werden, sondern auch die Metastasierung der Tumore.

Diese Befunde machen deutlich, daß eine Immunrekonstitution von SCID/beige Mäusen mit voraktivierten, humanen NK-Zellen nicht nur in vitro, sondern auch in vivo (im Tier) zu einer Lyse von Tumorzellen führt. Interessanterweise kann auch die Metastasierung durch humane NK-Zellen unterdrückt werden.

Ansprüche

1. Verwendung eines Hsp70-Proteins, eines C-terminalen Fragmentes davon oder eines Derivats davon oder eines Proteins mit einer Aminosäuresequenzhomologie zum C-terminalen Bereich (Aminosäuren 384-641) des Hsp70-Proteins von $\geq 70\%$ zur Herstellung eines Arzneimittels, Medizinprodukts, oder medizinischen Hilfsstoffs zur Aktivierung von NK-Zellen.
2. Verwendung eines Hsp70-Proteins, eines C-terminalen Fragmentes davon oder eines Derivats davon oder eines Proteins mit einer Aminosäuresequenzhomologie zum C-terminalen Bereich (Aminosäuren 384-641) des Hsp70-Proteins von $\geq 70\%$ zur in vitro oder ex vivo Aktivierung von NK-Zellen.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Aktivierung die Induktion einer durch NK-Zellen vermittelten Immunantwort umfaßt.
4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Aktivierung eine Stimulation der Proliferation von NK-Zellen und/oder eine Steigerung der zytolytischen Aktivität von NK-Zellen einschließt.
5. Verwendung nach Anspruch 4, wobei die zytolytische Aktivität gegenüber Tumorzellen, Zellen von Patienten mit Infektionserkrankungen gesteigert ist.
6. Verwendung nach Anspruch 5, wobei die zytolytische Aktivität gegenüber Leukämiezellen, Lymphomzellen, Tumorzellen, metastasierenden Zellen solider Tumore und Zellen von Patienten mit viralen, mykotischen und/oder bakteriellen Infektionserkrankungen gesteigert ist.

7. Verfahren zur ex vivo oder in vitro Aktivierung von NK-Zellen, wobei man eine NK-Zellen enthaltende physiologische Zellsuspension mit einem Hsp70-Protein, einem C-terminalen Fragment davon oder einem Derivat davon oder einem Protein mit einer Aminosäuresequenzhomologie zum C-terminalen Bereich (Aminosäuren 384-641) des Hsp70-Proteins von $\geq 70\%$ vermischt und inkubiert, um eine Aktivierung der NK-Zellen zu bewirken.
8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei die Aktivierung eine Stimulation der Proliferation der NK-Zellen und/oder eine Steigerung ihrer Zytotoxizität umfaßt.
9. Verfahren nach Anspruch 7 oder 8, wobei als NK-Zellen enthaltende physiologische Zellsuspension periphere, mononukleäre Blutzellen oder eine NK-Zellen enthaltende Fraktion hiervon eingesetzt werden.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 9, wobei die Zellsuspension weiterhin Hsp70 auf der Zelloberfläche exprimierende menschliche oder tierische Zellen enthält.
11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei als menschliche oder tierische Zellen Tumorzellen, Zellen von Patienten mit Infektionserkrankungen eingesetzt werden.
12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei als menschliche oder tierische Zellen Leukämiezellen, Lymphomzellen, Tumorzellen, metastasierende Zellen solider Tumore und Zellen von Patienten mit viralen, mykotischen und/oder bakteriellen Infektionserkrankungen eingesetzt werden.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 12, wobei die Zellen und Proteine enthaltende physiologische Zellsuspension mindestens 3 Stunden inkubiert wird.

14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei die Inkubation 4 Tage lang vorgenommen wird.
15. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6 oder Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 14, wobei zusätzlich ein Zytokin eingesetzt wird.
16. Verwendung oder Verfahren nach Anspruch 15, wobei als Zytokin ein Interleukin eingesetzt wird.
17. Verwendung oder Verfahren nach Anspruch 16, wobei als Interleukin IL-2, IL-12 und/oder IL-15 eingesetzt wird.
18. Verfahren zur in vivo-Aktivierung des Immunsystems, wobei man einem Patienten eine pharmazeutisch wirksame Menge von nach dem Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 17 aktivierten NK-Zellen verabreicht, gegebenenfalls in Kombination mit oder zeitlich vor einer pharmazeutisch wirksamen Menge eines Hsp70-Proteins, eines C-terminalen Fragmentes davon oder eines Derivats davon oder eines Proteins mit einer Aminosäuresequenzhomologie zum C-terminalen Bereich (Aminosäuren 384-641) des Hsp70-Proteins von $\geq 70\%$ verabreicht.
19. Verfahren zur in vivo-Aktivierung von NK-Zellen, wobei man einem Patienten eine pharmazeutisch wirksame Menge eines Hsp70-Proteins, eines C-terminalen Fragmentes davon oder eines Derivats davon oder eines Proteins mit einer Aminosäuresequenzhomologie zum C-terminalen Bereich (Aminosäuren 384-641) des Hsp70-Proteins von $\geq 70\%$ verabreicht.
20. Verfahren zur Behandlung von Tumoren, Krebserkrankungen, Infektionskrankheiten oder Autoimmunerkrankungen, wobei man einem Patienten eine pharmazeutisch wirksame Menge von nach dem Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 17 aktivierten NK-Zellen und/oder eines Hsp70-Proteins, eines

C-terminalen Fragmentes davon oder eines Derivats davon oder eines Proteins mit einer Aminosäuresequenzhomologie zum C-terminalen Bereich (Aminosäuren 384-641) des Hsp70-Proteins von $\geq 70\%$ verabreicht.

21. Verfahren nach Anspruch 20, wobei der Tumor ein solider Tumor oder eine Metastase ist.
22. Verfahren nach Anspruch 20, wobei die Krebserkrankung Leukämie oder ein Lymphom ist.
23. Verfahren nach Anspruch 20, wobei die Infektionskrankheit viralen, mykologischen oder bakteriellen Ursprungs ist.
24. Arzneimittel, Medizinprodukt oder medizinischer Hilfsstoff das/der ein Hsp70-Protein, ein C-terminales Fragment davon oder ein Derivat davon oder ein Protein mit einer Aminosäuresequenzhomologie zum C-terminalen Bereich (Aminosäuren 384-641) des Hsp70-Proteins von $\geq 70\%$ und/oder von nach dem Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 17 aktivierten NK-Zellen in einer therapeutisch wirksamen Menge sowie gegebenenfalls übliche Träger- und/oder Hilfsstoffe enthält.
25. Arzneimittel, Medizinprodukt oder medizinischer Hilfsstoff nach Anspruch 24, wobei das Protein in einer Konzentration von mindestens 10 $\mu\text{g/ml}$, bevorzugt bis zu 1000 $\mu\text{g/ml}$, vorliegt.
26. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6 oder Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 23 oder Arzneimittel, Medizinprodukt oder medizinischer Hilfsstoff nach Anspruch 24 oder 25, wobei das Hsp70-Protein ein humanes Protein ist.
27. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6 oder 26 oder Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 23 oder 26 oder

Arzneimittel, Medizinprodukt oder medizinischer Hilfsstoff nach einem der Ansprüche 24 bis 26, wobei das Hsp70-Protein oder dessen Fragment oder Derivat ein rekombinantes Protein ist.

28. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, 26 oder 27 oder Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 23, 26 oder 27 oder Arzneimittel, Medizinprodukt oder medizinischer Hilfsstoff nach einem der Ansprüche 24 bis 27, wobei das Hsp70-Protein das C-terminale Fragment die Aminosäuren 384 bis 561 von menschlichem Hsp70 oder den entsprechenden Bereich aus einem anderem Hsp70 umfaßt, das die erfindungsgemäßen Wirkungen umfaßt.
29. Verwendung der nach einem Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche behandelten NK-Zellen zur Therapie von Tumorerkrankungen, und/oder Infektionserkrankungen.
30. Verwendung nach Anspruch 29, wobei die Therapie durch Reinfundierung der behandelten NK-Zellen erfolgt.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Hsp70-Protein oder Fragmenten davon zur Aktivierung von NK-Zellen, Arzneimittel, Medizinprodukte oder medizinische Hilfsstoffe, die ein Hsp70-Protein oder Fragmente davon oder aktivierte NK-Zellen enthalten, Verfahren zur Aktivierung von NK-Zellen, sowie medizinische Verwendungen der durch das erfindungsgemäße Verfahren erhaltenen Produkte.